

Attorney's Docket No. 501-100001 / D1-A0103-US

RECEIVED  
REC'D 10/23/02

SEP 23 2002

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Hiroaki Yamamoto et al.

Art Unit : 1645

Serial No. : 10/081,644

Examiner : Unknown

Filed : February 21, 2002

TECH CENTER 1600/2900

Title : NOVEL ENONE REDUCTASES, METHODS FOR PRODUCING SAME, AND  
METHODS FOR SELECTIVELY REDUCING A CARBON-CARBON DOUBLE  
BOND OF AN  $\alpha,\beta$ -UNSATURATED KETONE USING THE REDUCTASES

*[Handwritten signatures: JP and LM]*

U.S. Patent and Trademark Office  
Arlington, VA 22202

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicant hereby confirms his claim of priority under 35 USC §119 from the following application(s):

Japan Application No. 2001-49363 filed February 23, 2001

A certified copy of the application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: 9/17/02

*[Handwritten signature: JKF]*

Janis K. Fraser, Ph.D., J.D.  
Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.  
225 Franklin Street  
Boston, MA 02110-2804  
Telephone: (617) 542-5070  
Facsimile: (617) 542-8906

10215043.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202.

Date of Deposit

September 17, 2002

Signature

*[Handwritten signature: Lucille M. Begalk]*

*[Handwritten signature: Lucille M. Begalk]*

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED

SEP 23 2002

TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年 2月 23日

出願番号

Application Number:

特願2001-049363

[ ST.10/C ]:

[ J P 2001-049363 ]

出願人

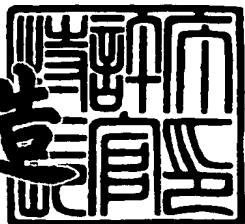
Applicant(s):

ダイセル化学工業株式会社

2002年 6月 14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3047864

【書類名】 特許願  
【整理番号】 D1-A0103  
【提出日】 平成13年 2月23日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 9/06  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市千現1-14-14-103  
【氏名】 山本 浩明  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市千現1-14-14-401  
【氏名】 木本 訓弘  
【特許出願人】  
【識別番号】 000002901  
【氏名又は名称】 ダイセル化学工業株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100102978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100108774  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 041092  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

特2001-049363

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なエノン還元酵素、その製造方法、およびこれを利用した $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の(A)から(C)に示す理化学的性質を有するエノン還元酵素。

(A) 作用

還元型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を電子供与体として、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を還元し、対応する飽和炭化水素を生成する。

(B) 基質特異性

(1)  $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を還元するが、実質的にケトンの還元活性は無い。(2) 電子供与体としては、還元型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドよりも還元型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸に対して、有意に高い活性を有する。(3) ケトンから $\beta$ 位炭素の2つの置換基がともに水素でない基質に対しては実質的に作用しない。

(4) 炭素-炭素2重結合が環状構造中に存在する基質に対しては実質的に作用しない。

(C) 至適pH

pH 6.5-7.0

【請求項2】 更に次に示す理化学的性質(D)-(E)を有する請求項1に記載のエノン還元酵素。

(D) 至適温度

37-45°C

(E) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約43,000。ゲル濾過により約42,000。

【請求項3】 クライベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属に由来する請求項1に記載の新規エノン還元酵素。

【請求項4】 クライベロマイセス属に属し、請求項1に記載のエノン還元酵素生産能を有する微生物を培養することを特徴とする請求項1に記載のエノン還元酵素を取得する方法。

【請求項5】 クライベロマイセス属に属する微生物が、クライベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 下記 (a) から (e) のいずれかに記載のエノン還元活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

- (a) 配列番号：1に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、
- (d) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
- (e) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

【請求項7】 請求項6に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

【請求項8】 請求項6に記載のポリヌクレオチドが挿入された組換えベクター。

【請求項9】 更に $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を補酵素とする酸化還元反応を触媒することができる脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドが挿入された、請求項8に記載の組換えベクター。

【請求項10】 請求項6に記載のポリヌクレオチド、または請求項8に記載のベクターを発現可能に保持した形質転換体。

【請求項11】 請求項10に記載の形質転換体を培養する工程を含む請求項7に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項12】下記(a)から(e)のいずれかに記載の、エノン還元活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：3、配列番号：5、および配列番号：7からなる群から選択されたいずれかに記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8からなる群から選択されたいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8からなる群から選択されたいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号：3、配列番号：5、および配列番号：7からなる群から選択されたいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8からなる群から選択されたいずれかに記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

【請求項13】請求項12に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

【請求項14】請求項12に記載のポリヌクレオチドが挿入された組換えベクター。

【請求項15】更に $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を補酵素とする酸化還元反応を触媒することができる脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドが挿入された、請求項14に記載の組換えベクター。

【請求項16】請求項12に記載のポリヌクレオチド、または請求項14に記載のベクターを発現可能に保持した形質転換体。

【請求項17】請求項16に記載の形質転換体を培養する工程を含む請求項13に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項18】請求項1に記載のエノン還元酵素、請求項7に記載の蛋白質

、請求項13に記載の蛋白質、該酵素または蛋白質を產生する微生物、および該微生物の処理物、からなる群から選択されるいずれかの酵素活性物質を $\alpha$ 、 $\beta$ 不飽和ケトンに作用させる工程を含む、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法。

【請求項19】該酵素または蛋白質を產生する微生物が、請求項11および／または請求項16に記載の形質転換体である請求項18に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 不飽和ケトン（エノン、enone）の $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和結合の還元に有用な、新規なエノン還元酵素、該酵素をコードするDNA、該酵素の製造方法、該酵素ならびに該酵素に相同性を有する蛋白質を用いた $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ケトンは、有機合成における原料として極めて汎用性の高い化合物である。また、ケトンは、医薬品合成において重要な光学活性中間体である光学活性アルコール、光学活性アミンの原料としても重要な化合物である。これらのケトンの前駆体として、例えば、アルデヒドとケトンの縮合反応により得られる $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンが有用である。

【0003】

例えば、アセトアルデヒドと2-ブタノンを縮合することにより3-メチル-3-ペンテン-2-オン（3-methyl-3-penten-2-one; J. Amer. Chem. Soc., 81, 1117-1119 (1959)）を容易に調製することができる。

【0004】

種々のケトンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル化合物の、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和結合を選択的に還元することにより得ることができる。カルボニル基の還元反応を伴わずに、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和結合のみを選択的に還元する方法としては、Ni触媒やPd-C触媒を用いた水素添加反応などが知られている（「接触水素化反応」p135、東京

化学同人 (1987))。これら の方法は、反応を継続することによりカルボニル基も還元される、環境に対して負荷の大きい金属を触媒として利用する、高圧の水素を利用するなどの問題がある。カルボニル基の還元は、ケトンの収率の低下を意味している。

## 【0005】

一方、生物学的な反応によって  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法としては、次のような生物を用いた方法が報告されている。

- ・植物細胞 (J. Nat. Prod. 56, 1406-1409 (1993))
- ・パン酵母 (Tetrahedron Lett. 52, 5197-5200 (1978), Bull. Chem. Soc. Jpn. 64, 3473-3475 (1991), Tetrahedron Asym. 6, 2143-2144 (1995) 他)
- ・カビ (J. Org. Chem. 47, 792-798 (1982))

しかしこれらの方法では、カルボニル基の還元反応を伴う、反応性が低い、細胞の大量調製が困難など問題がある。また、これらの生物より各種のエノン還元酵素が報告されているが、それをコードする遺伝子をクローニングした報告はなく、これらの酵素を容易に、かつ、大量に調製することは困難であった。

## 【0006】

この他に  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル化合物の還元酵素としては、以下のような酵素が報告されている。これらの酵素は、いずれも基質特異性が明らかにされていない、あるいは  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和結合に対する選択性が低いといった理由により、工業的な利用には向きである。

クロストリジウム・チオブチリカム (*Clostridium tyrobutyricum*) 由来の2-エノエート還元酵素 (2-enoate reductase, E.C.1.3.1.31) (J. Biotechnol. 6, 13-29 (1987))

クロストリジウム・クライベリ (*Clostridium kluyveri*) 由来のアクリロイル-CoA還元酵素 (acryloyl-CoA reductase) (Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 953-961 (1985))

パン酵母より精製されたエノン還元酵素YER-2 (京都大学・河合ら、第4回生体触媒シンポジウム講演要旨集p58 (2001))

パン酵母より精製されたエノン還元酵素E I 及びE I I (Eur. J. Biochem. 255, 271-278 (1998))

タバコ (*Nicotiana tabacum*) 細胞由来のエノン還元酵素 (ベルベノン還元酵素 (*verberone reductase*, 別名 p 90) (J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1993, 1426-1427, Chem. Lett. 2000, 850-851)

タバコ (*Nicotiana tabacum*) 細胞由来のエノン還元酵素であるカルボン還元酵素 (別名、エノン還元酵素-I) (Phytochemistry 31, 2599-2603 (1992))

タバコ (*Nicotiana tabacum*) 細胞由来のエノン還元酵素であるエノン還元酵素-I I, p 44, p 74

植物の1種ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) やアスタシア・ロンガ (*Astasia longa*) から精製されたエノン還元酵素 (Phytochemistry 49, 49-53 (1998))

ラット肝臓より精製されたエノン還元酵素 (Arch. Biochem. Biophys. 282, 183-187 (1990))

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和結合を選択的に還元し、 $\alpha$ ,  $\beta$ -飽和ケトンを生成する酵素活性を有する新規なエノン還元酵素、該酵素をコードする遺伝子を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該酵素並びに該酵素を生産する生物を利用して $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法の提供を課題とする。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、メチルビニルケトンから2-ブタノンを生成する酵素をスクリーニングした結果、クライベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) が目的とする活性を有することを見出した。次に、クライベロマイセス・ラクティスの菌体より目的とする活性を有する酵素を精製し、その性質を明らかにした。この酵素は、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和結合を $\beta$ -ニコチンアミドアデニジヌクレオチドリン酸依存的に選択的に還元すること、ケトンの還元

活性を実質的に持たないことを確認した。更に本発明者らは、該酵素をコードする遺伝子をクローニングし、その構造を明らかにして、この遺伝子が新規な遺伝子であることを確認した。また、この遺伝子を異種の生物で高発現させて、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和結合をNADPH依存的に還元する高い選択性と高い活性を併せ持つ形質転換株を得た。そしてこの酵素やそのホモログ、あるいはこれらを產生する細胞等によって、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合の選択性的還元が可能となることを見出し本発明を完成した。以下、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸はNADP、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドはNAD、そしてこれらの還元型をNADPHあるいはNADHと記載する。

## 【0009】

すなわち本発明は、次のエノン還元酵素、該酵素をコードするDNA、該酵素の製造方法、該酵素ならびに該酵素に相同性を有する蛋白質を用いた $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択性的に還元する方法に関する。

〔1〕次の(A)から(C)に示す理化学的性質を有するエノン還元酵素。

## (A) 作用

NADPHを電子供与体として、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を還元し、対応する飽和炭化水素を生成する。

## (B) 基質特異性

(1)  $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を還元するが、実質的にケトンの還元活性は無い。

(2)電子供与体としては、NADHよりもNADPHに対して、有意に高い活性を有する。

(3)ケトンから $\beta$ 位炭素の2つの置換基がともに水素でない基質に対しては実質的に作用しない。

(4)炭素-炭素2重結合が環状構造中に存在する基質に対しては実質的に作用しない。

## (C) 至適pH

pH 6.5-7.0

〔2〕更に次に示す理化学的性質(D)-(E)を有する〔1〕に記載のエノン

還元酵素。

(D) 至適温度

37-45°C

(E) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム 一ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約43,000。ゲル濾過により約42,000。

[3] クライベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属に由来する [1] に記載の新規エノン還元酵素。

[4] クライベロマイセス属に属し、[1] に記載のエノン還元酵素生産能を有する微生物を培養することを特徴とする [1] に記載のエノン還元酵素を取得する方法。

[5] クライベロマイセス属に属する微生物が、クライベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) である、[4] に記載の方法。

[6] 下記 (a) から (e) のいずれかに記載のエノン還元活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

[7] [6] に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

[8] [6] に記載のポリヌクレオチドが挿入された組換えベクター。

[9] 更にNADPを補酵素とする酸化還元反応を触媒することができる脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドが挿入された、[8] に記載の組換えベクター。

[10] [6] に記載のポリヌクレオチド、または [8] に記載のベクターを発

現可能に保持した形質転換体。

[11] [10] に記載の形質転換体を培養する工程を含む [7] に記載の蛋白質の製造方法。

[12] 下記 (a) から (e) のいずれかに記載の、エノン還元活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：3、配列番号：5、および配列番号：7からなる群から選択されたいずれかに記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8からなる群から選択されたいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8からなる群から選択されたいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号：3、配列番号：5、および配列番号：7からなる群から選択されたいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8からなる群から選択されたいずれかに記載のアミノ酸配列と 60%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

[13] [12] に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

[14] [12] に記載のポリヌクレオチドが挿入された組換えベクター。

[15] 更にNADPを補酵素とする酸化還元反応を触媒することができる脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドが挿入された、[14] に記載の組換えベクター。

[16] [12] に記載のポリヌクレオチド、または [14] に記載のベクターを発現可能に保持した形質転換体。

[17] [16] に記載の形質転換体を培養する工程を含む [13] に記載の蛋白質の製造方法。

〔18〕 〔1〕に記載のエノン還元酵素、〔7〕に記載の蛋白質、〔13〕に記載の蛋白質、該酵素または蛋白質を產生する微生物、および該微生物の処理物、からなる群から選択されるいづれかの酵素活性物質を $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンに作用させる工程を含む、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法。

〔19〕 該酵素または蛋白質を產生する微生物が、〔11〕および/または〔16〕に記載の形質転換体である〔18〕に記載の方法。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、次の(A) - (C)に示す理化学的性質を有する酵素を提供する。

##### (A) 作用

NADPHを電子供与体として、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を還元し、対応する飽和炭化水素を生成する。

##### (B) 基質特異性

(1)  $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を還元するが、実質的にケトンの還元活性は無い。

(2) 電子供与体としては、NADHよりもNADPHに対して、有意に高い活性を有する。

(3) ケトンから $\beta$ 位炭素の2つの置換基がともに水素でない基質に対しては実質的に作用しない。

(4) 炭素-炭素2重結合が環状構造中に存在する基質に対しては実質的に作用しない。

##### (C) 至適pH

pH 6.5 - 7.0

#### 【0011】

本発明のエノン還元酵素は、望ましくは更に次の理化学的的性質(D) - (E)を備える。

##### (D) 至適温度

37 - 45°C

## (E) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGEと略す）により約43,000。ゲル濾過により約42,000。

## 【0012】

本発明の酵素のNADPHに対する反応性がNADHに対する反応性に比較して有意に高いとは、少なくとも2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは5倍以上高い活性を言う。NADPHとNADHに対する反応性は、実施例に示すような方法によって比較することができる。すなわち、同一の $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンを基質とし、両者を用いてケトンを生成させる。このときに消費されるNADPH、あるいはNADHの量を比較すれば、反応性を比較することができる。

## 【0013】

また本発明において、エノン還元酵素が実質的にケトンの還元活性が無いこと、あるいは、エノン還元酵素が基質に対して実質的に作用しないこととは、具体的には、メチルビニルケトンにおけるオレフィンに対する還元活性の1%以下であることを言う。

## 【0014】

本発明の酵素は、該酵素を產生する微生物から通常の蛋白質の精製方法により、精製することができる。例えば、菌体を破碎後、プロタミン硫酸沈澱を行い、その遠心分離上清を硫酸アンモニウムを用いて塩析し、更に、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲルろ過などを組み合わせることにより、精製することができる。

## 【0015】

本発明において、エノンに対する還元活性は、次のようにして確認することができる。本発明においてエノンとは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 不飽和ケトンを意味する。

エノンに対する還元活性測定法：

50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)、0.2 mM NADPH、20 mM メチルビニルケトン及び酵素を含む反応液中30°Cで反応させ、NADPHの減少とともに340 nmの吸光度の減少を測定する。1Uは、1分間に1  $\mu$ molのNADPHの減少を触媒する酵素量とした。また、蛋白質の定量は、バイオラッド製蛋白質アッ

セイキットを用いた色素結合法により行った。

【0016】

上記のような理化学的性状を持つエノン還元酵素は、たとえばクライベロマイセス属酵母の培養物より精製することができる。クライベロマイセス属酵母としては、クライベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) が特に本発明によるエノン還元酵素の產生能に優れる。本発明のエノン還元酵素を得るために利用することができるクライベロマイセス・ラクティスは、たとえば、IFO 0433、IFO 1012、IFO 1267、IFO 1673、IFO 1903として財団法人発酵研究所より入手することができる。

【0017】

上記微生物は、YM培地等の真菌の培養に用いられる一般的な培地で培養される。十分に増殖させた後に菌体を回収し、2-メルカプトエタノールやフェニルメタンフルホニルフルオリド等の還元剤やプロテアーゼ阻害剤を加えた緩衝液中で破碎して無細胞抽出液とする。無細胞抽出液から、蛋白質の溶解度による分画(有機溶媒による沈澱や硫安などによる塩析など)や、陽イオン交換、陰イオン交換、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィーや、キレート、色素、抗体などを用いたアフィニティーコロマトグラフィーなどを適宜組み合わせることにより精製することができる。たとえば、フェニルーセファロースを用いた疎水クロマトグラフィー、MonoQを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、フェニルースーパーロースを用いた疎水クロマトグラフィー等を経て電気泳動的にほぼ単一バンドにまで精製することができる。

【0018】

クライベロマイセス・ラクティスから精製することができる本発明によるエノン還元酵素は、上記理化学的性質(A) - (C)、および(D) - (E)を有する。クライベロマイセス・ラクティスから精製することができる本発明によるエノン還元酵素は、公知の $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル化合物の還元酵素に対して、明らかに新規な酵素である。

【0019】

たとえば、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル化合物の還元酵素としては、クロストリ

ジウム・チオブチリカム (*Clostridium tyrobutyricum*) 由来の2-エノエート還元酵素 (2-enoate reductase, E.C.1.3.1.31) が知られている。本酵素は、NADH依存的に (E) - 2-メチル-2-ブテン酸を還元し、(R) - 2-メチル酪酸を生成する (J. Biotechnol. 6, 13-29 (1987))。また本酵素は、カルボニル残基がカルボン酸、アルデヒド、あるいはケト酸の場合に基質とするが、ケトン体に対する活性は報告されていない。更に、分子量は、ゲルfiltrationにおいて80万-94万であり、本発明の酵素 (SDS-PAGEで43,000、ゲルfiltrationで42,000) とは明確に異なる。

## 【0020】

また、クロストリジウム・クライベリ (*Clostridium kluyveri*) 由来のアクリロイル-CoA還元酵素 (acryloyl-CoA reductase) がエチルビニルケトン還元活性を有することが報告されている (Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 953-961 (1985)) が、本酵素は補酵素として還元型メチルビオローゲンを利用し、分子量はゲルfiltrationで28,400、SDS-PAGEで14,200であり本発明の酵素とは異なる。

## 【0021】

また、パン酵母より複数のエノン還元酵素が精製され報告されている。京都大学の河合らは、パン酵母よりエノン還元酵素 (YER-2) を精製し、酵素化学的性質を報告している (第4回生体触媒シンポジウム講演要旨集p58 (2001))。YER-2は、反応の至適pHが7.5であり本発明の酵素 (至適pH 6.5-7.0) とは明らかに異なる。Wannerらは、同じパン酵母より2種類のエノン還元酵素 (EI及びEII) の精製と性質を報告している (Eur. J. Biochem. 255, 271-278 (1998))。EIIは補酵素としてNADHを利用し、EIはSDS-PAGEにより34,000と37,000のサブニットからなる分子量75,000のヘテロダイマーであり、本発明の酵素とは異なる。

## 【0022】

植物では、タバコ (*Nicotiana tabacum*) の細胞より多数のエノン還元酵素 (ベルベノン還元酵素 (別名p90)、カルボン還元酵素 (別名、エノン還元酵素-I)、エノン還元酵素-II、p44、p74) が精製され、その性質が報告されている。ベルベノン還元酵素 (verberone reductase, p90)、p44は

環状の  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンに対する活性を有すること (J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1993, 1426-1427, Chem. Lett. 2000, 850-851) から本発明の酵素とは異なる。カルボン (carbone) 還元酵素は補酵素としてNADHを利用すること (Phytochemistry 31, 2599-2603 (1992))、エノン還元酵素-I I は、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの  $\beta$  位炭素に水素を有さない化合物 ((R)-pulegone) も基質になること (Phytochemistry 31, 2599-2603 (1992))、p 74 は分子量が74,000であることから、これらの酵素は明らかに本発明の酵素とは異なる。.

## 【0023】

また、植物の1種ユーグレナ・グラシリス (Euglena gracilis) やアスタシア・ロンガ (Astasia longa) からもエノン還元酵素が精製されている (Phytochemistry 49, 49-53 (1998)) が、これらの酵素はいずれも補酵素としてNADHを利用するため、本発明の酵素とは異なる。

## 【0024】

また、動物ではラット肝臓よりエノン還元酵素が精製されている (Arch. Biochem. Biophys. 282, 183-187 (1990))。この酵素は、分子量39,500のモノマー酵素だが、環状基質への反応性、 $\beta$  位2置換基質への反応性、至適pHなどが報告されていない。

## 【0025】

本発明は、エノン還元酵素およびそのホモログをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明において、ポリヌクレオチドは、DNAやRNAのような天然に存在するポリヌクレオチドであることもできるし、人工的に合成されたヌクレオチド誘導体を含むポリヌクレオチドであっても良い。

## 【0026】

本発明のエノン還元酵素をコードするポリヌクレオチドは、たとえば配列番号：1に示す塩基配列を含む。配列番号：1に示す塩基配列は、配列番号：2に示すアミノ酸配列を含む蛋白質をコードしており、このアミノ酸配列を含む蛋白質は、本発明によるエノン還元酵素の好ましい態様を構成する。

なお本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードすることができるあらゆる塩基配列を含む。1つのアミノ酸に対応するコドン

は、1~6存在することから、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAは、配列番号：1のみとは限らず、配列番号：1に記載されるDNAと等価とみなすことができるDNAは複数存在する。

## 【0027】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、エノン還元酵素活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む。当業者であれば、配列番号：1に記載のDNAに部位特異的変異導入法 (Nucleic Acid Res. 10, pp.6487 (1982), Methods in Enzymol. 100, p p.448 (1983), Molecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), PCR A Practical Approach IRL Press pp.200 (1991) )などを用いて、適宜置換、欠失、挿入、および／または付加変異を導入することが可能である。

## 【0028】

また、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズできるポリヌクレオチドであつて、かつ、エノン還元酵素活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドも含む。ストリンジエントな条件でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとは、配列番号：1に記載中の任意の少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、たとえば40、60または100個の連續した配列を一つまたは複数選択したDNAをプローブDNAとし、たとえばECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmaica Biotech社製)を用いて、マニュアルに記載の条件 (wash: 42°C、0.5x SSCを含むprimary wash buffer)において、ハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。

## 【0029】

ストリンジエントな条件下で配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドには、配列番号：1と類似する塩基配列を含むものが含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号：2のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードしている可能性

が高い。したがって当業者は、このようなポリヌクレオチドの中から、本明細書の記載に基づいて、エノン還元酵素活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを選択することができる。

## 【0030】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%または80%、より好ましくは90%以上のホモロジーを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む。蛋白質のホモロジー検索は、たとえばSWISS-PROT、PIRなどの蛋白質のアミノ酸配列に関するデータベースやDNA Databank of JAPAN(DDBJ)、EMBL、Gene-BankなどのDNAに関するデータベース、DNA配列を元にした予想アミノ酸配列に関するデータベースなどを対象に、FASTA programやBLAST programなどを用いて、たとえば、インターネット上で行うことができる。配列番号：2に記載のアミノ酸配列を用いてSWISS-PROTを対象にBLAST programを用いてホモロジー検索を行った結果、既知の蛋白質の中でもっとも高いホモロジーを示したのは、*Cochliobolus carbonum* *toxD* proteinの36%(Identity)、54%(Positives)であった。本発明の60%以上のホモロジーとは、たとえば、BLAST programを用いたPositiveの相同性の値を示す。

## 【0031】

このBLAST検索において、本発明のエノン還元酵素にホモロジーを有する機能未知の予想オープンリーディングフレーム(ORF)が見いだされた。具体的には、サッカロマイセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のゲノム解析の結果より得られた3種類の予想ORFであり、それぞれYNN4、YL60、およびYCZ2と命名されている。これらの予想アミノ酸配列の本発明のエノン還元酵素に対するホモロジーは、54%，51%，53% (identity)，69%，68%，69% (Positive) であった。これらの予想蛋白質が本発明のエノン還元酵素活性を有するか否かを明らかにするために、DDBJに登録されているDNA配列を基にプライマーを合成し、サッカロマイセス・セレビジエのゲノムDNAより予想ORF部分をPCRクローニングした。各ORFを発現ベクターに導入し、大腸菌を形質転換して得られた形質転換株を培養して、それぞれの蛋白質を発現させた結果、YNN4、YL60、およびYCZ2がいずれ

もエノン還元活性を有することを確認した。これらの結果は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを有する蛋白質が、本発明のエノン還元活性を有すると推測するに十分な蓋然性があることを示している。YN N4、YL60、およびYCZ2の塩基配列、およびアミノ酸配列を、以下の配列番号に示した。これらのORFによってエノン還元酵素活性を有する蛋白質がもたらされることは知られていない。

	塩基配列	アミノ酸配列
YN N4	配列番号：3	配列番号：4
YL60	配列番号：5	配列番号：6
YCZ2	配列番号：7	配列番号：8

配列番号：3、配列番号：5、および配列番号：7に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドに含まれる。またこれらのポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列、配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8に記載されたアミノ酸配列をコードする全ての塩基配列からなるポリヌクレオチドは、本発明に含まれる。更に、配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本発明に含まれる。

### 【0032】

すなわち本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8に記載のアミノ酸配列のいずれかにおいて、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、エノン還元酵素活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む。このようなポリヌクレオチドは、先に述べたような方法に基づいて取得することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：3、配列番号：5、および配列番号：7に記載の塩基配列のいずれかからなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズできるポリヌクレオチドであって、かつ、エノン還元酵素活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドも含む。ストリンジエントな条件でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとは、配列番号：3、配列番号：5、

および配列番号：7に記載中の任意の少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、たとえば40、60または100個の連続した配列を一つまたは複数選択したDNAをプローブDNAとし、たとえばECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmaica Biotech社製)を用いて、マニュアルに記載の条件 (wash: 42°C、0.5x SSCを含むprimary wash buffer)において、ハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。

## 【0033】

ストリングエントな条件下で配列番号：3、配列番号：5、あるいは配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドには、これらの塩基配列と類似する塩基配列を含むものが含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号：4、配列番号：6、あるいは配列番号：8のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードしている可能性が高い。

## 【0034】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：4、配列番号：6、あるいは配列番号：8に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%または80%、より好ましくは90%以上のホモロジーを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む。蛋白質のホモロジー検索は、既に述べたような方法によって行うことができる。

## 【0035】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のエノン還元酵素の遺伝子工学的な製造に有用である。あるいは本発明のポリヌクレオチドによって、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンからの $\alpha$ 、 $\beta$ -飽和ケトンの製造に有用なエノン還元酵素活性を有する微生物を遺伝子工学的に作り出すことができる。

## 【0036】

本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有し、かつエノン還元酵素活性を有する蛋白質、及びそのホモログを含む。配列番号：2に示すアミノ酸配列を含む蛋白質は、本発明によるエノン還元酵素の好ましい態様を構成する。

## 【0037】

本発明のエノン還元酵素のホモログとは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含む。当業者であれば、配列番号：1に記載のDNAに部位特異的変異導入法 (Nucleic Acid Res. 10,pp.6487 (1982) , Methods in Enzymol .100,pp.448 (1983) , Molecular Cloning 2ndEdt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) , PCR A Practical Approach IRL Press pp.200 (1991) )などを用いて、適宜置換、欠失、挿入、および／または付加変異を導入することによりエノン還元酵素のホモログをコードするDNAを得ることができる。そのエノン還元酵素のホモログをコードするDNAを宿主に導入して発現させることにより、配列番号：2に記載のエノン還元酵素のホモログを得ることが可能である。

## 【0038】

さらに、本発明のエノン還元酵素のホモログとは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%または80%、より好ましくは90%以上のホモジニーを有する蛋白質をいう。蛋白質のホモジニー検索は、たとえばSWISS-PROT、PIRなどの蛋白質のアミノ酸配列に関するデータベースやDNA Databank of JAPAN(DDBJ)、EMBL、Gene-BankなどのDNAに関するデータベース、DNA配列を元にした予想したアミノ酸配列に関するデータベースなどを対象に、FASTA programやBLAST programなどを用いて、たとえば、インターネット上で行うことができる。配列番号：2に記載のアミノ酸配列を用いてDDBJを対象にBLAST programを用いてホモジニー検索を行った結果、既知の蛋白質の中でもっとも高いホモジニーを示したのは、*Cochliobolus carbonum toxD protein*の36%(Identity)、54%(Positives)であった。。本発明の60%以上のホモジニーとは、たとえば、BLAST programを用いたPositiveの相同性の値を示す。

## 【0039】

このBLAST検索において、本発明のエノン還元酵素にホモジニーを有する機能未知の予想オープンリーディングフレーム (ORF) が見いだされた。具体的には、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のゲノム解析の結果より得られた3種類の予想ORFであり、それぞれYNN4、YL60、およびYCZ2と命名されている。これらの予想アミノ酸配列の本発明のエノン還元酵素に対するホ

モロジーは、54%, 51%, 53% (identity), 69%, 68%, 69% (Positive) であった。これらの予想蛋白質が本発明のエノン還元酵素活性を有するか否かを明らかにするために、DDBJに登録されているDNA配列を基にプライマーを合成し、サッカロマイセス・セレビジエのゲノムDNAより予想ORF部分をPCRクローニングした。各ORFを発現ベクターに導入し、大腸菌を形質転換して得られた形質転換株を培養して、それぞれの蛋白質を発現させた結果、YNN4、YL60、およびYCZ2がいずれもエノン還元活性を有することを確認した。これらの結果は、配列番号：2に60%以上のホモロジーを有する蛋白質が、本発明のエノン還元活性を有すると推測するに十分な蓋然性があることを示している。

## 【0040】

すなわち、配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8に記載のアミノ酸配列のいずれかからなるアミノ酸配列を含む蛋白質は、本発明のエノン還元酵素のホモログの好ましい態様を構成する。

## 【0041】

本発明のエノン還元酵素をコードするポリヌクレオチドは、たとえば、以下のような方法によって単離することができる。

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：1に記載された塩基配列に基づいて他の生物からPCRクローニングやハイブリダイズによって単離することもできる。配列番号：1に記載の塩基配列は、クライベロマイセス・ラクティスより単離された遺伝子のものである。配列番号：1に記載の塩基配列を利用してPCR用プライマーをデザインし、クライベロマイセス属酵母やサッカロマイセス属酵母等の微生物から、エノン還元酵素活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを得ることができる。たとえば、サッカロマイセス・セレビジエよりPCRによって単離することができる配列番号：3、配列番号：5、並びに配列番号：7に記載された塩基配列を有するポリヌクレオチドが、本発明のエノン還元酵素活性を有する蛋白質をコードしていることは、既に述べたとおりである。あるいは、これらの塩基配列が明らかにされたポリヌクレオチドをプローブとして、この他の種に由来し、同様の酵素活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを単離することもできる。

## 【0042】

また前記理化学的性質(A)－(C)を有するエノン還元酵素を単離し、その構造的特徴をもとに、本発明のポリヌクレオチドを得ることもできる。本発明の酵素を精製後、N末端アミノ酸配列を解析し、さらに、リジルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼなどの酵素により切断後、逆相液体クロマトグラフィーなどによりペプチド断片を精製後プロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を解析することにより複数のアミノ酸配列を決めることができる。

## 【0043】

部分的なアミノ酸配列が明らかになれば、それをコードする塩基配列を推定することができる。推定された塩基配列、あるいは配列番号：1に示す塩基配列を元にPCR用のプライマーを設計し、酵素生産株の染色体DNAもしくは、cDNAライブラリーを鋳型として、PCRを行うことにより本発明のDNAの一部を得ることができる。

## 【0044】

さらに、得られたDNA断片をプローブとして、酵素生産株の染色体DNAの制限酵素消化物をファージ、プラスミドなどに導入し、大腸菌を形質転換して得られたライブラリーやcDNAライブラリーを利用して、コロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーションなどにより、本発明のDNAを得ることができる。

## 【0045】

また、PCRにより得られたDNA断片の塩基配列を解析し、得られた配列から、既知のDNAの外側に伸長させるためのPCRプライマーを設計し、酵素生産株の染色体DNAを適当な制限酵素で消化後、自己環化反応によりDNAを鋳型として逆PCRを行うことにより(Genetics 120, 621-623 (1988))、また、RACE法(Rapid Amplification of cDNA End、「PCR実験マニュアル」p25-33, HBJ出版局)などにより本発明のDNAを得ることも可能である。

なお本発明のDNAは、以上のような方法によってクローニングされたゲノムDNA、あるいはcDNAの他、合成によって得ることもできる。

## 【0046】

このようにして単離された、本発明によるエノン還元酵素をコードするDNAを公知の発現ベクターに挿入することにより、エノン還元酵素発現ベクターが提供される。また、この発現ベクターで形質転換した形質転換体を培養することにより、本発明のエノン還元酵素を組換え体から得ることができる。

## 【0047】

本発明の組換えベクターは、本発明のエノン還元酵素をコードするDNAとともにNADPを補酵素とする酸化反応を触媒する脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドが挿入された組換えベクターも含む。これらの脱水素酵素として、グルコース脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ホスホグルコン酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素などが挙げられる。これらの酵素は、本発明のエノン還元酵素の補酵素であるNADPHを、NADP<sup>+</sup>から再生する際に利用することができる。

## 【0048】

本発明においてNADPHを補酵素とするエノン還元酵素を発現させるために、形質転換の対象となる微生物は、NADPHを補酵素とするエノン還元酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む組み換えベクターにより形質転換され、NADPHを補酵素とするエノン還元酵素活性を発現することができる生物であれば特に制限はない。利用可能な微生物としては、たとえば以下のような微生物を示すことができる。

エシェリヒア(*Escherichia*)属

バチルス(*Bacillus*)属

シュードモナス(*Pseudomonas*)属

セラチア(*Serratia*)属

ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属

コリネバクテリイウム(*Corynebacterium*)属

ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属

ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属など宿主ベクター系の開発されている細菌

ロドコッカス(*Rhodococcus*)属

ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属など宿主ベクター系の開発されている放線菌

サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属

クライベロマイセス(*Kluyveromyces*)属

シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属

チゴサッカロマイセス(*Zygosaccharomyces*)属

ヤロウイア(*Yarrowia*)属

トリコスポロン(*Trichosporon*)属

ロドスボリジウム(*Rhodosporidium*)属

ピキア(*Pichia*)属

キャンディダ(*Candida*)属などの宿主ベクター系の開発されている酵母

ノイロスポラ(*Neurospora*)属

アスペルギルス(*Aspergillus*)属

セファロスポリウム(*Cephalosporium*)属

トリコデルマ(*Trichoderma*)属などの宿主ベクター系の開発されているカビ

#### 【0049】

形質転換体の作製のための手順および宿主に適合した組み換えベクターの構築は、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる（例えば、Sambrookら、モレキュラー・クローニング、Cold Spring Harbor Laboratories）。微生物中などにおいて、本発明のNADP<sup>+</sup>を補酵素とするエノン還元酵素遺伝子を発現させるためには、まず微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中にこのDNAを導入し、その遺伝情報を転写・翻訳させる必要がある。そのためには、転写・翻訳を制御するユニットにあたるプロモーターを本発明のDNA鎖の5'-側上流に、より好ましくはターミネーターを3'-側下流に、それぞれ組み込めばよい。このプロモーター、ターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター、ターミネーターを用いる必要がある。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターなどに關して「微生物学基礎講座8 遺伝子工学・共立出版」、特に酵母については、Ad

v. *Biochem. Eng.* 43, 75-102 (1990)、*Yeast* 8, 423-488 (1992)、などに詳細に記述されている。

#### 【0050】

例えばエシェリヒア属、特に大腸菌エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)においては、プラスミドベクターとして、pBR、pUC系プラスミドを利用でき、lac(β-ガラクトシダーゼ)、trp(トリプトファンオペロン)、tac、trc (lac、trpの融合)、λファージ PL、PRなどに由来するプロモーターなどが利用できる。また、ターミネーターとしては、trpA由来、ファージ由来、rrnBリボソーマルRNA由来のターミネーターなどを用いることができる。これらの中で、市販のpSE420 (Invitrogen製) のマルチクローニングサイトを一部改変したベクターpSE420D (特開2000-189170に記載) が好適に利用できる。

#### 【0051】

バチルス属においては、ベクターとしてpUB110系プラスミド、pC194系プラスミドなどが利用可能であり、染色体にインテグレートすることもできる。また、プロモーター、ターミネーターとしてapr(アルカリプロテアーゼ)、npr(中性プロテアーゼ)、amy(α-アミラーゼ)などが利用できる。

#### 【0052】

シュードモナス属においては、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セパシア(*Pseudomonas cepacia*)などで宿主ベクター系が開発されている。トルエン化合物の分解に関与するプラスミドTOLプラスミドを基本にした広宿主ベクター(RSF1010などに由来する自律的複製に必要な遺伝子を含む)pKT240などが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとして、リパーゼ(特開平5-284973)遺伝子などが利用できる。

#### 【0053】

ブレビバクテリウム属特に、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*)においては、pAJ43(Gene 39, 281 (1985))などのプラスミドベクターが利用可能である。プロモーター、ターミネーターとしては、大腸菌で使用されているプロモーター、ターミネーターがそのまま利用可能である。

## 【0054】

コリネバクテリウム属、特にコリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)においては、pCS11(特開昭57-183799)、pCB101(Mol. Gen. Gen et. 196, 175 (1984))などのプラスミドベクターが利用可能である。

## 【0055】

ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属においては、pHV1301(FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)、pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)) などがプラスミドベクターとして利用可能である。

## 【0056】

ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属においては、ストレプトコッカス属用に開発されたpAM $\beta$ 1 (J. Bacteriol. 137, 614 (1979)) などが利用可能であり、プロモーターとして大腸菌で利用されているものが利用可能である。

## 【0057】

ロドコッカス(*Rhodococcus*)属においては、ロドコッカス・ロドクロウス(*Rhodococcus rhodochrous*)から単離されたプラスミドベクターが使用可能である (J. Gen. Microbiol. 138, 1003 (1992) )。

## 【0058】

ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属においては、HopwoodらのGenetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratories (1985)に記載の方法に従って、プラスミドを構築することができる。特に、ストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*)においては、pIJ486 (Mol. Gen. Genet. 203, 468-478, 1986)、pKC1064(Gene 103, 97-99 (1991) )、pUWL-KS (Gene 165, 149-150 (1995) )が使用できる。また、ストレプトマイセス・バージニア(*Streptomyces virginiae*)においても、同様のプラスミドを使用することができる (Actinomycetol. 11, 46-53 (1997) )。

## 【0059】

サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属、特にサッカロマイセス・セレビジアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)においては、YRp系、YE<sub>p</sub>系、YCp系、YIp系プラスミドが利用可能であり、染色体内に多コピー存在するリボソームDNAとの相同組み

換えを利用したインテグレーションベクター(EP 537456など)は、多コピーで遺伝子を導入でき、かつ安定に遺伝子を保持できるため極めて有用である。また、ADH(アルコール脱水素酵素)、GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)、PHO(酸性フォスファターゼ)、GAL(β-ガラクトシダーゼ)、PGK(ホスホグリセレートキナーゼ)、ENO(エノラーゼ)などのプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

## 【0060】

クライベロマイセス属、特にクライベロマイセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)においては、サッカロマイセス・セレビジアエ由来 $2\mu\text{m}$ 系プラスミド、pKD1系プラスミド(J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981))、キラー活性に関与するpGK11由来プラスミド、クライベロマイセス属における自律増殖遺伝子KARS系プラスミド、リボソームDNAなどとの相同組み換えにより染色体中にインテグレート可能なベクタープラスミド(EP 537456など)などが利用可能である。また、ADH、PGKなどに由来するプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

## 【0061】

シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属においては、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来のARS(自律複製に関与する遺伝子)及びサッカロマイセス・セレビジアエ由来の栄養要求性を相補する選択マーカーを含むプラスミドベクターが利用可能である(Mol. Cell. Biol. 6, 80 (1986))。また、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来のADHプロモーターなどが利用できる(EMBO J. 6, 729 (1987))。特に、pAUR224は、宝酒造から市販されており容易に利用できる。

## 【0062】

チゴサッカロマイセス属(*Zygosaccharomyces*)においては、チゴサッカロマイセス・ロウキシ(*Zygosaccharomyces rouxii*)由来のpSB3(Nucleic Acids Res. 13, 4267 (1985))などに由来するプラスミドベクターが利用可能であり、サッカロマイセス・セレビジアエ由来PHO5プロモーターや、チゴサッカロマイセス・ロウキシ由来GAP-Zr(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)のプロモーター(Agri. Biol. Chem. 54, 2521 (1990))などが利用可能である。

## 【0063】

ピキア(*Pichia*)属においては、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などにピキア由来自律複製に関与する遺伝子(PARS1、PARS2)などを利用した宿主ベクター系が開発されており(Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985))、高濃度培養とメタノールで誘導可能なAOXなど強いプロモーターが利用できる(Nucleic Acids Res. 15, 3859 (1987))。また、ピキア・アンガスタ(*Pichia angusta*、旧名ハンゼヌラ・ポリモルファ *Hansenula polymorpha*)において宿主ベクター系が開発されている。ベクターとしては、ピキア・アンガスタ由来自律複製に関与する遺伝子(HARS1、HARS2)も利用可能であるが、比較的不安定であるため、染色体への多コピーインテグレーションが有効である(Yeast 7, 431-443 (1991))。また、メタノールなどで誘導されるAOX(アルコールオキシダーゼ)、FDH(ギ酸脱水素酵素)のプロモーターなどが利用可能である。

## 【0064】

キャンディダ(*Candida*)属においては、キャンディダ・マルトーサ(*Candida malto-sa*)、キャンディダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、キャンディダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*)、キャンディダ・ウチルス(*Candida utilis*)などにおいて宿主ベクター系が開発されている。キャンディダ・マルトーサにおいてはキャンディダ・マルトーサ由来ARSがクローニングされ(Agri. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987))、これを利用したベクターが開発されている。また、キャンディダ・ウチルスにおいては、染色体インテグレートタイプのベクターは強力なプロモーターが開発されている(特開平 08-173170)。

## 【0065】

アスペルギルス(*Aspergillus*)属においては、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリジー(*Aspergillus oryzae*)などがカビの中で最もよく研究されており、プラスミドや染色体へのインテグレーションが利用可能であり、菌体外プロテアーゼやアミラーゼ由来のプロモーターが利用可能である(Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989))。

## 【0066】

トリコデルマ(*Trichoderma*)属においては、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)を利用したホストベクター系が開発され、菌体外セルラーゼ遺伝子

由来プロモーターなどが利用できる (Biotechnology 7, 596-603 (1989))。

【0067】

また、微生物以外でも、植物、動物において様々な宿主・ベクター系が開発されており、特に蚕を用いた昆虫 (Nature 315, 592-594 (1985)) や菜種、トウモロコシ、ジャガイモなどの植物中に大量に異種蛋白質を発現させる系が開発されており、好適に利用できる。

【0068】

また、上記の方法で得られる本発明のエノン還元酵素を発現する形質転換体は、本発明の酵素の製造や、以下に述べる  $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合の選択的還元による  $\alpha$ 、 $\beta$ -飽和ケトンの製造に用いることができる。

【0069】

すなわち本発明は、前記エノン還元酵素、該酵素または蛋白質を產生する微生物、および該微生物の処理物、からなる群から選択されるいずれかの酵素活性物質を  $\alpha$ 、 $\beta$  不飽和ケトンに作用させる工程を含む、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法に関する。本発明の酵素、酵素を含む培養物、その処理物が反応溶液と接触させることにより、目的とする酵素反応を行わせることができる。

【0070】

本発明の方法において、エノン還元酵素としては、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質、そのホモログ、あるいは前記理化学的性質 (A) - (C) を有するエノン還元酵素を用いることができる。エノン還元酵素は、精製されたものの他、粗精製酵素として用いることもできる。更に本発明においては、エノン還元酵素として、エノン還元酵素の產生能を有する細胞を用いることもできる。本発明において使用するエノン還元酵素生産能を有する細胞は、NADPH依存性エノン還元酵素生産能を有するクライベロマイセス属に属するすべての菌株、突然変異株、変種、遺伝子操作技術の利用により作成された本発明の酵素生産能を獲得した形質転換体を含む。

【0071】

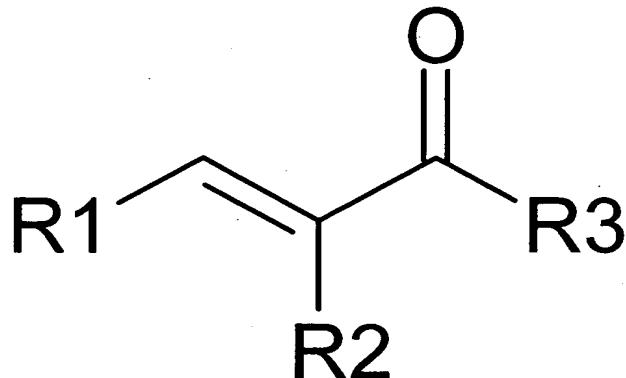
なお、酵素と反応溶液の接触形態はこれらの具体例に限定されるものではない

。反応溶液は、基質や酵素反応に必要な補酵素であるNADPHを酵素活性の発現に望ましい環境を与える適当な溶媒に溶解したものである。本発明におけるエノン還元酵素を含む微生物の処理物には、具体的には界面活性剤やトルエンなどの有機溶媒処理によって細胞膜の透過性を変化させた微生物、あるいはガラスビーズや酵素処理によって菌体を破碎した無細胞抽出液やそれを部分精製したものなどが含まれる。

## 【0072】

本発明における $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンは限定されない。たとえば、次の一般式Iで表される化合物を、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンとして示すことができる。

## 【化1】



(式中、R1は、置換または無置換のアルキル基、置換または無置換のアルケニル基、置換または無置換のアラルキル基、置換または無置換のアルコキシ基を示す。R2は水素もしくは、置換又は無置換の短鎖アルキル基を示、R3は、置換又は無置換の短鎖アルキル基を示す。)

より具体的には、メチルビニルケトン、エチルビニルケトン、3-ペンテン-2-オン、3-メチル-3-ペンテン-2-オン等が好適に用いられる。

## 【0073】

更に、本発明の酵素、または、該酵素を産生する微生物もしくはその処理物を $\alpha$ -置換を有する $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンに作用させることにより、光学活性な飽和ケトンの合成にも利用できる。

## 【0074】

前記本発明によるケトン製造方法においては、NADPHの再生系を組み合わせることができる。エノン還元酵素による還元反応に付随して、NADPHからNADP<sup>+</sup>が生成する。NADP<sup>+</sup>からNADPHへの再生は、微生物の含有するNADP<sup>+</sup>からNADPHを再生する酵素（系）によって行うことができる。これらNADP<sup>+</sup>還元能は、反応系にグルコースまたはエタノールを添加することにより、増強することが可能である。また、NADP<sup>+</sup>からNADPHを生成する能力を有する酵素、例えば、グルコース脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ホスホグルコン酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素などを含む微生物、その処理物、ならびに部分精製もしくは精製酵素を用いてNADPHの再生を行うことができる。例えば、上記グルコース脱水素酵素の場合には、グルコースからδ-グルコノラクトンへの変換を利用することにより、NADPHの再生が行われる。

## 【0075】

これらのNADPH再生に必要な反応を構成する成分は、本発明によるケトンの製造のための反応系に添加、もしくは固定化したものを添加することができる。あるいはNADPHの交換が可能な膜を介して接触させることができる。

## 【0076】

また、本発明のDNAを含む組換えベクターで形質転換した微生物を、生存した状態で前記ケトンの製造方法に利用する場合には、NADPH再生のための付加的な反応系を不要とできる場合がある。すなわち、NADPH再生活性の高い微生物を宿主として用いることにより、形質転換体を用いた還元反応において、NADPH再生用の酵素を添加することなく効率的な反応が行える。さらに、NADPH再生に利用可能なグルコース脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素、有機酸脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素など）などの遺伝子を、本発明のNADPH依存性エノン還元酵素をコードするDNAと同時に宿主に導入することによって、より効率的なNADPH再生酵素とNADPH依存性エノン還元酵素の発現、還元反応を行うことも可能である。これらの2つもしくはそれ以上の遺伝子の宿主への導入には、大腸菌においては不和合性をさけるために複製起源のことなる複数のベクターに別々に遺伝子を導入した組み換えベクターにより宿主を形質転

換する方法や、単一のベクターに両遺伝子を導入する方法、片方、もしくは、両方の遺伝子を染色体中に導入する方法などを利用することができる。

## 【0077】

本発明におけるNADPH再生に利用可能なグルコース脱水素酵素として、バシラス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) に由来するグルコース脱水素酵素を示すことができる。この酵素をコードする遺伝子は既に単離されている。あるいは既に明らかにされているその塩基配列に基づいて、PCRやハイブリダイズスクリーニングによって、当該微生物から取得することもできる。

## 【0078】

単一のベクター中に複数の遺伝子を導入する場合には、プロモーター、ターミネーターなど発現制御に関わる領域をそれぞれの遺伝子に連結する方法やラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させることも可能である。

## 【0079】

本発明の酵素を用いた還元反応は、水中で、あるいは水に溶解しにくい有機溶媒と水との2相中で実施することができる。水に溶解しにくい有機溶媒としては、例えば、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、n-ヘキサン、イソオクタンなどを用いることができる。あるいは、エタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル等の有機溶媒と水性媒体との混合系中で行うこともできる。

## 【0080】

本発明の反応は、固定化酵素、膜リアクター等を利用して行うことも可能である。特に、本反応の基質となる $\alpha, \beta$ -不飽和ケトンは水に対して難溶性の物が多いために、ポリプロピレンなどの疎水性の膜を介して本発明の酵素、本発明の酵素を含む微生物、その処理物を含む水相と基質 $\alpha, \beta$ -不飽和ケトンを含む有機溶媒相を接触させ、反応させることにより基質及び生成物による阻害作用を低減させることができる。

## 【0081】

本発明のエノン還元酵素による酵素反応は、以下の条件で行うことができる。

- ・反応温度：4-55°C、好ましくは10-45°C
- ・pH：4-9、好ましくは5.5-8、さらに好ましくはpH6.5-7.0
- ・基質濃度：0.01-90%、好ましくは0.1-20%

【0082】

反応系には必要に応じて補酵素NADP<sup>+</sup>またはNADPHを0.001 mM-100 mM、好ましくは、0.01-10 mM添加することができる。また、基質は反応開始時に一括して添加することも可能であるが、反応液中の基質濃度が高くなりすぎないように連続的、もしくは非連続的に添加することが望ましい。

【0083】

NADPH再生のために反応系に添加される化合物、例えばグルコース脱水素酵素を利用する場合のグルコース、ギ酸脱水素酵素を利用する場合のギ酸、アルコール脱水素酵素を利用する場合のエタノールもしくは2-プロパノール、グルタミン酸脱水素酵素を利用する場合のL-グルタミン酸、リンゴ酸脱水素酵素を利用する場合のL-リンゴ酸、等は、基質 $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和ケトンに対してモル比で0.1-20、好ましくは0.5-5倍過剰に添加することができる。NADPH再生用の酵素、例えばグルコース脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素、有機酸脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素など）等は、本発明のNADPH依存性エノン還元酵素に比較して酵素活性で0.1-100倍、好ましくは0.5-20倍程度添加することができる。

【0084】

本発明の $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和ケトンの還元により生成するケトンの精製は、菌体、蛋白質の遠心分離、膜処理等による分離、溶媒抽出、蒸留、クロマトグラフィー等を適当に組み合わせることにより行うことができる。

【0085】

これら各種合成反応に利用する本発明の酵素は、精製酵素に限定されず、部分精製酵素、本酵素を含む微生物菌体、その処理物も含まれる。なお本発明における処理物とは、菌体、精製酵素、あるいは部分精製酵素などを様々な方法で固定化処理したものを総称して示す用語である。

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定さ

れるものではない。

【0086】

【実施例】

【実施例1】（エノン還元酵素の精製）

クライベロマイセス・ラクティスIFO 1267株を1. 2LのYM培地（グルコース20g/L、酵母エキス3g/L、麦芽エキス3g/L、ペプトン5g/L、pH 6.0）で培養し、遠心分離により菌体を調製した。得られた温菌体を50 mMリシン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）、0.02%2-メルカプトエタノール及び2 mMフェニルメタンスルホニルフルオリド（PMSF）で懸濁し、ビードビーター（Biospec社製）により破碎後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液にプロタミン硫酸を添加し、遠心分離により除核酸した上清を得た。その上清に硫安を30%飽和になるまで添加し、30%硫安を含む標準緩衝液（10 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.5）、0.01%2-メルカプトエタノール、10%グリセロール）で平衡化したフェニルーセファロースHP（2.6cm×10cm）に添加し、硫安濃度を30%～0%の勾配溶出を行った。

【0087】

NADPH依存性のメチルビニルケトン還元活性は、勾配溶出部分に2つのピークがみられた。これらのピークのうち後方に溶出したピーク部分を回収し、限外濾過により濃縮した。

濃縮した酵素液を標準緩衝液に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したMono Q（0.5cm×5cm）に添加した。標準緩衝液でカラムを洗浄した後、0～0.5M塩化ナトリウムの勾配溶出を行った。溶出した活性画分を回収し、限外濾過により濃縮した。

濃縮酵素液に硫安を30%飽和添加し、30%飽和硫安を含む標準緩衝液で平衡化したフェニルースーパーロース（0.5cm×5cm）に添加した。同緩衝液で洗浄後、30%～0%飽和硫安で勾配溶出を行った。溶出した活性画分を回収した。

【0088】

フェニルースーパーロースにより得られた活性画分を、SDS-PAGEにより解析し

た結果、単一バンドであった（図1）。精製酵素の比活性は約31.7 U/mgであった。精製の要約を表1に示す。

## 【0089】

【表1】

ステップ	蛋白質 (mg)	酵素活性 (U)	比活性 (U/mg)
無細胞抽出液	3390	1360	0.401
プロタミン硫酸沈殿	1480	1220	0.851
フェニル-セファロース	156	222	1.42
MonoQ	2.70	117	43.4
フェニル-スーパーロース	0.162	5.14	31.7

## 【0090】

## 【実施例2】（エノン還元酵素の分子量測定）

実施例1で得られた酵素のサブユニットの分子量をSDS-PAGEにより求めた結果、4.3万であった。また、スーパーデックスG200のゲルろ過カラムを用いて分子量を測定したところ、約4.2万であった。これらの結果より、本発明のエノン還元酵素はモノマー酵素と予想された。

## 【0091】

## 【実施例3】（エノン還元酵素の至適pH）

リン酸カリウム緩衝液、ブリットン・ロビンソンの広域緩衝液を用いてpHを変化させて、実施例1で得られた酵素のメチルビニルケトンの還元活性を調べ、最大活性を100とした相対活性で表し、図2に示した。反応の至適pHは6.5-7.0であった。

## 【0092】

## 【実施例4】（エノン還元酵素の至適温度）

実施例1で得られた酵素を標準反応条件のうち温度だけを変化させて、メチル

ビニルケトンの還元活性を測定し、最大活性を100とした相対活性で表し、図3に示した。反応の至適温度は37-45℃であった。

## 【0093】

## 〔実施例5〕（エノン還元酵素の基質特異性）

実施例1で得られた酵素を種々のエノン、ケトン、およびアルデヒドと反応させ、その還元反応の活性をメチルビニルケトンの還元を100とした相対活性で表し、表2に示した。

## 【表2】

基質	補酵素	相対活性
メチルビニルケトン	NADPH	100
エチルビニルケトン	NADPH	537
3-ペンテン-2-オン	NADPH	16
4-メチル-3-ペンテン-2-オン	NADPH	1
3-メチル-3-ペンテン-2-オン	NADPH	48
2-メチル-2-シクロペンテン-1-オン	NADPH	0
3-メチル-2-シクロペンテン-1-オン	NADPH	0
2-ブタノン	NADPH	0
クロトン酸	NADPH	0
メチルグリコキサール	NADPH	1
2, 3-ブタンジオン	NADPH	1
アセトフェノン	NADPH	0
メチルビニルケトン	NADH	14
エチルビニルケトン	NADH	52

## 【0094】

## 〔実施例6〕（エノン還元酵素を用いた3-ペンタノンの合成）

200 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、44 mg NADH、エノン還元酵素

1 U、0.2%エチルビニルケトンを含む反応液中で、25℃で終夜反応させた。生成した3-ペンタノンをガスクロマトグラフィーで定量し、出発原料であるエチルビニルケトンに対する収率を求めた。ガスクロマトグラフィーの条件は以下のとおりである。すなわち、Porapak PS (Waters, mesh 50-80, 3.2mm × 210cm) を用い、カラム温度を130℃とし、水素炎イオン化検出器 (FID) を利用して分析した。その結果、反応の収率は100%であった。

## 【0095】

## [実施例7] (エノン還元酵素の部分アミノ酸配列)

実施例1で得られた酵素を用いて、SDS-PAGEのゲルより、エノン還元酵素を含むゲル断片を切り出し、2回洗浄後、リジルエンドペプチダーゼを用いて、35℃で終夜イン・ゲル・ダイジェションを行った。消化したペプチドを逆相HPLC (東ソー製TSK gel ODS-80-Ts, 2.0mm × 250mm) を用い、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 中でアセトニトリルのグラジエント溶出によりペプチドを分離し、分取した。

## 【0096】

分取したペプチドピーク2種をlep\_64、lep\_65とし、それぞれプロテインシーケンサー (Hewlett Packard G1005A Protein Sequencer System) によりアミノ酸配列の解析を行った。lep\_64、lep\_65のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：9、10で示した。

## 【0097】

配列番号：9：lep\_64

Ser-Tyr-Gly-Ala-Asp-Asp-Val-Phe-Asp-Tyr-His-Asp

配列番号：10：lep\_65

Ile-Gly-Pro-Glu-Gly-Ser-Ile-Leu-Gly-Cys-Asp-Ile

## 【0098】

## [実施例8] (クライベロマイセス・ラクティスからの染色体DNAの精製)

クライベロマイセス・ラクティス IFO 1267株をYM培地で培養し、菌体を調製した。菌体からの染色体DNAの精製は、Meth. Cell Biol. 29, 39-44 (1975) に記載の方法により行った。

## 【0099】

〔実施例9〕（エノン還元酵素遺伝子のコア領域のクローニング）

lep\_64、lep\_65のアミノ酸配列を元にそれぞれセンスプライマー、アンチセンスプライマーを計3種類合成した。それぞれの塩基配列を配列番号：11(KR2-64U)、12(KR2-65D)、13(KR2-65E)に示した。

## 【0100】

配列番号：11：KR2-64U

TGRTARTCRAANACRTCRT

配列番号：12：KR2-65D

ATWGGHCCWGARGGHTCNAT

配列番号：13：KR2-65E

ATWGGHCCNGARGGHAGYAT

## 【0101】

3種類のうち2種類の組み合わせでプライマーを選び、プライマーを各50pmol、dNTP 1.0 nmol、クライベロマイセス・ラクティス由来染色体DNA 50 ng、AmpliTaq用緩衝液（宝酒造製）、AmpliTaq 2 U（宝酒造製）を含む50 μLの反応液を用い、変性（94°C、30秒）、アニール（45°C、30秒）、伸長（70°C、1分）を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400（パーキンエルマー製）を用いて行った。

## 【0102】

PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、KR2-64UとKR2-65Dの組み合わせにおいて特異的と思われるバンドが検出できた。得られたDNA断片を、フェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿として回収した。得られたDNA断片を、pT7Blue(R) Tベクター（Novagen社）とTakara Ligation Kitを用いて、ライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換した。

## 【0103】

形質転換株をアンピシリン（50 μg/mL）を含むLB培地（1%バクトートリプトン、0.5%バクトー酵母エキス、1%塩化ナトリウム、以下、LB培地と略す）プレート上で生育させ、Blue/Whiteセレクション法により選別されたいつかの白色のコロニーより市販のM13-21 (TGTAAAACGACGGCCAGT (配列番号：28)

)、M13-RP (CAGGAAACAGCTATGACC (配列番号：29)) プライマーを用いてコロニーダイレクトPCRを行い、挿入断片のサイズを確認した。目的とするDNA断片が挿入されていると考えられるコロニーをアンピシリンを含む液体LB培地で培養し、Flexi-Prep (ファルマシア製) によりプラスミドを精製し、pKLR2とした。

## 【0104】

精製したプラスミドを用いて、挿入DNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列の解析には、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit (パーキンエルマー製)を用いてPCRを行い、DNAシーケンサーABI PRISM<sup>TM</sup> 310(パーキンエルマー製)により行った。決定されたコア領域の塩基配列を配列番号：14として示した。

## 【0105】

## 〔実施例10〕 (エノン還元酵素遺伝子のコア領域周辺の塩基配列の解析)

クライベロマイセス・ラクティス由来染色体DNAを制限酵素HaeII、またはPstIで消化し、T4リガーゼを用いて16°Cで終夜セルフ・ライゲーション反応により、各断片を環化させた。次に、プライマーKL2-5U (配列番号：15) およびKL2-3D (配列番号：16) を各100 pmol、環化DNAを25 ng、Ex-Taq用緩衝液 (宝酒造製)、Ex-Taq 2U (宝酒造製)を含む50 μLの反応液を用い、変性 (94°C、30秒)、アニール (55°C、30秒)、伸長 (72°C、7分) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製)を用いて行った。PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、5000 b.pあたりに特異的と思われるバンドが検出できた。このDNA断片をSephaglas BandPrep Kit(ファルマシア製)により精製し、塩基配列をプライマーウォーキング法により解析した。

用いたプライマーは、KL2-5U、KL2-3D、KL2-Sq1 (配列番号：17)、KL2-Sq2 (配列番号：18)、KL2-Sq3 (配列番号：19) の5種類。DNA塩基配列の解析には、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit (パーキンエルマー製)を用いてPCRを行い、DNAシーケンサーABI PRISM<sup>TM</sup> 310 (パーキンエルマー製)により行った。その結果、エノン還元酵素のORF配列を決定することができた。決定したDNA配列は配列番号：1に、コードする蛋白質の配列は配列番号：2に示す。DNA配列からのORF検索、予想アミノ酸配列への翻訳などは、Gene

tyx-WIN (ソフトウェア開発株式会社製) を用いて行った。

配列番号：15：KL2-5U

TCCGGTACCGACAACTGTACCAAGCAATGTC

配列番号：16：KL2-3D

ATCGGTACCTATACTAAGATTGTAAGTGTGC

配列番号：17：KL2-Sq1

CCGGGTACCCCTTTAGGGTGA

配列番号：18：KL2-Sq2

TCATGAAGCCACAGTTAAATTGCG

配列番号：19：KL2-Sq3

ATATTCAATGATGGATATCACCG

### 【0106】

〔実施例11〕（エノン還元酵素遺伝子のクローニング）

エノン還元酵素の構造遺伝子配列を元にORFクローニング用のプライマーKLCR2-N（配列番号：20）、KLCR2-C（配列番号：21）を合成した。プライマーを各50 pmol、dNTP 10 nmol、クライペロマイセス・ラクティス由来染色体DNA 50 ng、Pfu Turbo-DNA polymerase用緩衝液（STRATAGENE製）、Pfu Turbo-DNA polymerase 2.5 U（STRATAGENE製）を含む50 μLの反応液を用い、変性（95°C、2分30秒）、アニール（55°C、1分）、伸長（75°C、1分30秒）を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400（パーキンエルマー製）を用いて行った。

配列番号：20：KLCR2-N

CTGGAATTCTACCATGGCTTCAGTTCCAACCACTCAAAAG

配列番号：21：KLCR2-C

GACAAGCTTCTAGATTATAACCTGGCAACATACTTAACA

### 【0107】

PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、特異的と思われるバンドが検出できた。

得られたDNA断片を、フェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿として回収した。DNA断片を制限酵素NcoI、XbaIで2重消化し、アガロースゲル電気泳

動を行い、目的とするバンドの部分を切り出し、Sepaglas BandPrep Kit(ファルマシア製)により精製した。得られたDNA断片を、NcoI、XbaIで2重消化したpSE420DとTakara Ligation Kitを用いて、ライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換した。

## 【0108】

形質転換株をアンピシリン (50  $\mu$ g/mL) を含むLB培地プレート上で生育させ、いくつかのコロニーよりKLCR2-N、KLCR2-Cプライマーを用いてコロニーダイレクトPCRを行い、挿入断片のサイズを確認した。目的のサイズである事が確認できたコロニーよりプラスミドを精製し、挿入断片の塩基配列を解析した。目的とするエノン還元酵素遺伝子を持つプラスミドをpSE-KLR1 (図4) とした。

## 【0109】

## 【実施例12】 (組換えエノン還元酵素の大腸菌による生産)

エノン還元酵素を発現するプラスミドpSE-KLR1で形質転換された大腸菌HB101株をアンピシリンを含む液体LB培地で終夜30°C培養し、0.1mM IPTGを加え、さらに4時間培養を行った。

菌体を遠心分離により集菌した後、0.02% 2-メルカプトエタノール、2mM PMSF、10%グリセリンを含む50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、密閉式超音波破碎装置UCD-200TM (コスマバイオ製) を用いて3分間処理することで、菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心分離し、その上清を菌体抽出液中として回収し、種々の基質に対する活性を測定した。また該プラスミドを含まない大腸菌HB101株をLB培地で終夜培養し、0.1mM IPTG添加後さらに4時間培養した菌体を、同様に破碎して種々の基質に対する活性を測定した。結果を表3に示す。

## 【表3】

基質	宿主のみ	HB101 (pSE-KLR1)	
	比活性 (U/mg)	比活性 (U/mg)	相対活性 (%)
メチルビニルケトン	0.066	7.78	100
エチルビニルケトン	0.073	41.8	537
3-ペンテン-2-オン	0.015	1.23	15.9
3-メチル-3-ペンテン-2-オン	0.004	2.52	32.4

## 【0110】

〔実施例13〕（サッカロマイセス・セレビジエからの染色体DNAの精製）

サッカロマイセス・セレビジエ X2180-1B (Yeast Genetic Stock Center) をY  
M培地で培養し、菌体を調製した。菌体からの染色体DNAの精製は、Meth. Cell B  
iol. 29, 39-44 (1975) に記載の方法により行った。

## 【0111】

〔実施例14〕（エノン還元酵素のホモログ YNN4 のクローニング）

DDBJに登録されている予想蛋白質YNN4 (SWISS-PROT Accession No., P53912)  
に対応するDNA配列 (DDBJ Accession No. Z46843) を基にPCR用プライマーYNN4-  
ATG1 (配列番号: 22)、YNN-TAA1 (配列番号: 23) を合成した。

## 【0112】

プライマーを各 2.5 pmol、dNTP 1.0 nmol、サッカロマイセス・セレビジエ由来  
染色体DNA 5.0 ng、Pfu DNA polymerase用緩衝液 (STRATAGENE製)、Pfu DNA polymerase 2U (STRATAGENE製)を含む 50 μLの反応液を用い、変性 (95 °C、45  
秒)、アニール (50 °C、1分)、伸長 (75 °C、6分) を30サイクル、GeneAmp  
PCR System 2400 (パーキンエルマー製)をPCRを行った結果、特異的な増幅産  
物が得られた。

増幅産物をフェノール処理後、制限酵素AflIII, XbaIで2重消化し、制限酵素N  
coI, XbaIで2重消化したベクターpSE420DとTAKARA Ligation Kit によりライゲ  
ーションした。ライゲーションしたDNAにより大腸菌JM109株を形質転換し、アン  
ピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラス  
ミドをFlexiPrepにより精製した。得られたプラスミドをpSE-YNN4とした。

## 【0113】

プラスミドの挿入DNA部分の塩基配列を解析し、その結果を配列番号: 3 に示  
した。得られた塩基配列は、DDBJに登録されたいる塩基配列と完全に一致した。  
配列番号: 3 の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 4 に示した。

配列番号: 22 : YNN4-ATG1

CAACATGTCTGCCTCGATTCCAGA

配列番号: 23 : YNN4-TAA1

CAGTCTAGATTATTCAGACGGCAACCAAC

## 【0114】

[実施例15] (エノン還元酵素のホモログ YL60 のクローニング)

DDBJに登録されている予想蛋白質YL60 (SWISS-PROT Accession No., P54007) に対応するDNA配列 (DDBJ Accession No. U22383) を基にPCR用プライマーYL60-ATG2 (配列番号: 24) 、YL60-TAA1 (配列番号: 25) を合成した。

プライマーを各 2.5 pmol、dNTP 1.0 nmol、サッカロマイセス・セレビジエ由来染色体DNA 5.0 ng、Pfu DNA polymerase用緩衝液 (STRATAGENE製)、Pfu DNA polymerase 2U (STRATAGENE製) を含む 50 μLの反応液を用い、変性 (95°C、45秒) 、アニール (50°C、1分) 、伸長 (75°C、6分) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) をPCRを行った結果、特異的な増幅産物が得られた。

## 【0115】

増幅産物をフェノール処理後、制限酵素NcoI, XbaIで2重消化し、制限酵素NcoI, XbaIで2重消化したベクターpSE420DとTAKARA Ligation Kitによりライゲーションした。

ライゲーションしたDNAにより大腸菌JM109株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製した。得られたプラスミドをpSE-YL60とした。

プラスミドの挿入DNA部分の塩基配列を解析し、その結果を配列番号: 5に示した。得られた塩基配列は、DDBJに登録されている塩基配列と完全に一致した。配列番号: 5の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 6に示した。

## 【0116】

配列番号: 24 : YL60-ATG2

CAACCATGGCTCAAGTTGCAATTCCAGAAACC

配列番号: 25 : YL60-TAA1

GAATCTAGATTAGTTAATACGGCAACGAGTTTCAC

## 【0117】

[実施例16] (エノン還元酵素のホモログ YCZ2 のクローニング)

DDBJに登録されている予想蛋白質YCZ2 (SWISS-PROT Accession No., P25608) に対応するDNA配列 (DDBJ Accession No. X59720) を基にPCR用プライマーYCZ2-ATG1 (配列番号: 26) 、YCZ2-TAA1 (配列番号: 27) を合成した。

プライマーを各 25 pmol、dNTP 10 nmol、サッカロマイセス・セレビジエ由来染色体DNA 50 ng、Pfu DNA polymerase用緩衝液 (STRATAGENE製)、Pfu DNA polymerase 2 U (STRATAGENE製) を含む 50 μL の反応液を用い、変性 (95°C、45秒) 、アニール (50°C、1分) 、伸長 (75°C、6分) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) をPCRを行った結果、特異的な増幅産物が得られた。

#### 【0118】

増幅産物をフェノール処理後、制限酵素BspHI, XbaIで2重消化し、制限酵素NcoI, XbaIで2重消化したベクターpSE420DとTAKARA Ligation Kitによりライゲーションした。

ライゲーションしたDNAにより大腸菌JM109株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製した。得られたプラスミドをpSE-YCZ2とした。

プラスミドの挿入DNA部分の塩基配列を解析し、その結果を配列番号: 7に示した。得られた塩基配列は、1089位のAがCに置換していたが、アミノ酸は同じであった。塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 8に示した。

配列番号: 26 : YCZ2-ATG1

GAAATCATGAAAGCTGTCGTCAATTGAA

配列番号: 27 : YCZ2-TAA1

GTTTCTAGATTAGTTAATACGGCAACKAGTTTTCA

#### 【0119】

〔実施例17〕 (エノン還元酵素のホモログ YNN4、YL60、およびYCZ2 の活性確認)

pSE-YNN4, pSE-YL60, pSE-YCZ2をそれぞれ含有する大腸菌JM109株をアンピシリンを含むLB培地で培養し、0.1 mM IPTGにより誘導を4時間行い、遠心分離により集菌菌体を得た。それぞれの菌体を菌体破碎液 (50mM KPB pH 8.0, 1mM EDTA

、0.02% 2-ME、2mM PMSF、10% Glycerol) に懸濁し、超音波により菌体を破碎後、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液とした。

各無細胞抽出液を用いてエノン還元活性を測定した結果、0.268 U/mg-protein, 0.198 U/mg-protein, 0.133 U/mg-proteinの活性が得られ、本発明の酵素の3種類のホモログがいずれもエノン還元酵素活性を有することが確認された。

## 【0120】

## 【発明の効果】

$\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元することができる新規なエノン還元酵素が提供された。この酵素によって、医薬品の原料などに有用なケトンを酵素的に、製造することが可能となった。本発明のエノン還元酵素は、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合に対する選択性に優れる。したがって、目的とするケトンを高い収率で得ることができる。

## 【0121】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> A novel enone reductase, manufacturing of same, and method for reducing a carbon-carbon double bond of alfa, beta-unsaturated ketone.

<130> D1-A0103

<140>

<141>

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1113

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces lactis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1113)

&lt;400&gt; 1

atg tca gtt cca acc act caa aaa gcc gtc atc att gaa ggt gac aaa 48

Met Ser Val Pro Thr Thr Gln Lys Ala Val Ile Ile Glu Gly Asp Lys

1

5

10

15

gct gtt gtt aaa aca gat gtc tca gtt cca gaa tta aag gag ggt aca 96

Ala Val Val Lys Thr Asp Val Ser Val Pro Glu Leu Lys Glu Gly Thr

20

25

30

gcc ttg gtg aag gtt gag gct gtt ggt aac cca act gat tgg aag 144

Ala Leu Val Lys Val Glu Ala Val Ala Gly Asn Pro Thr Asp Trp Lys

35

40

45

cat att gct tat aag att ggt cca gaa ggt tca att cta gga tgt gac 192

His Ile Ala Tyr Lys Ile Gly Pro Glu Gly Ser Ile Leu Gly Cys Asp

50

55

60

att gct ggt aca gtt gtc aaa ctt gga cca aat gct agt act gac ttg 240

Ile Ala Gly Thr Val Val Lys Leu Gly Pro Asn Ala Ser Thr Asp Leu

65

70

75

80

aag gtt gga gat acc ggt ttc ggt ttt gtt cac ggt gct tcc caa aca 288  
 Lys Val Gly Asp Thr Gly Phe Gly Phe Val His Gly Ala Ser Gln Thr

85

90

95

gat cct aaa aat ggt gca ttt gct gaa tat gcc agg gtt tat cca cct 336  
 Asp Pro Lys Asn Gly Ala Phe Ala Glu Tyr Ala Arg Val Tyr Pro Pro  
 100 105 110

ttg ttt tac aag agt aac tta act cac tca act gct gat gaa att tct 384  
 Leu Phe Tyr Lys Ser Asn Leu Thr His Ser Thr Ala Asp Glu Ile Ser  
 115 120 125

gaa ggc cct gtg aag aac ttc gaa tct gct gca tca ttg cca gtt tcg 432  
 Glu Gly Pro Val Lys Asn Phe Glu Ser Ala Ala Ser Leu Pro Val Ser  
 130 135 140

ttg aca act gct ggt gtt agt ttg tgt cat cac ttg ggc tca aaa atg 480  
 Leu Thr Thr Ala Gly Val Ser Leu Cys His His Leu Gly Ser Lys Met  
 145 150 155 160

gaa tgg cac cca tct acc ccg caa cat act cat cca tta ttg att tgg 528  
 Glu Trp His Pro Ser Thr Pro Gln His Thr His Pro Leu Leu Ile Trp  
 165 170 175

ggt ggt gct aca gca gtg ggt caa caa cta atc caa gtt gcc aaa cat 576  
 Gly Gly Ala Thr Ala Val Gly Gln Gln Leu Ile Gln Val Ala Lys His  
 180 185 190

atc aat gct tat act aag att gta act gtt gct tct aaa aag cat gaa 624  
 Ile Asn Ala Tyr Thr Lys Ile Val Thr Val Ala Ser Lys Lys His Glu  
 195 200 205

aag ctt tta aag tct tat ggt gct gat gat gtc ttt gac tat cat gat 672  
 Lys Leu Leu Lys Ser Tyr Gly Ala Asp Asp Val Phe Asp Tyr His Asp  
 210 215 220

gca ggc gtt att gag cag atc aaa tcg aag tat cca aac ctg caa cat 720  
 Ala Gly Val Ile Glu Gln Ile Lys Ser Lys Tyr Pro Asn Leu Gln His  
 225 230 235 240

gtt att gac gct gtg gga agc gaa gat agt atc ccc gag gcc tat aaa 768  
 Val Ile Asp Ala Val Gly Ser Glu Asp Ser Ile Pro Glu Ala Tyr Lys  
 245 250 255

gtc aca gca gat agt cta cct gcc aca tta tta gaa gtg gtt cca atg 816  
 Val Thr Ala Asp Ser Leu Pro Ala Thr Leu Leu Glu Val Val Pro Met  
 260 265 270

acc att gaa agc att cct gaa gaa atc aga aaa gat aat gtt aaa att 864  
 Thr Ile Glu Ser Ile Pro Glu Glu Ile Arg Lys Asp Asn Val Lys Ile  
 275 280 285

gat att act ttg ttg tat cgt gca tct ggt caa gaa att cta ttg ggt 912  
 Asp Ile Thr Leu Leu Tyr Arg Ala Ser Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly  
 290 295 300

gca aca aga ttt cct gct agt cca gaa tat cat gaa gcc aca gtt aaa 960

Ala Thr Arg Phe Pro Ala Ser Pro Glu Tyr His Glu Ala Thr Val Lys

305 310 315 320

ttc gtt aag ttt ata aat cca cac ctt aac aac ggt gat atc cat cat 1008

Phe Val Lys Phe Ile Asn Pro His Leu Asn Asn Gly Asp Ile His His

325 330 335

atg aat att aaa gtt ttc agc aac ggc tta gat gat gtc cca gct ctc 1056

Met Asn Ile Lys Val Phe Ser Asn Gly Leu Asp Asp Val Pro Ala Leu

340 345 350

act gaa ggt ata aaa gaa ggt aaa aac aaa aat gtt aag tat gtt gcc 1104

Thr Glu Gly Ile Lys Glu Gly Lys Asn Lys Asn Val Lys Tyr Val Ala

355 360 365

agg tta taa 1113

Arg Leu

370

<210> 2

<211> 370

<212> PRT

<213> Kluyveromyces lactis

<400> 2

Met Ser Val Pro Thr Thr Gln Lys Ala Val Ile Ile Glu Gly Asp Lys

1 5 10 15

Ala Val Val Lys Thr Asp Val Ser Val Pro Glu Leu Lys Glu Gly Thr  
 20 25 30  
 Ala Leu Val Lys Val Glu Ala Val Ala Gly Asn Pro Thr Asp Trp Lys  
 35 40 45  
 His Ile Ala Tyr Lys Ile Gly Pro Glu Gly Ser Ile Leu Gly Cys Asp  
 50 55 60  
 Ile Ala Gly Thr Val Val Lys Leu Gly Pro Asn Ala Ser Thr Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Val Gly Asp Thr Gly Phe Gly Phe Val His Gly Ala Ser Gln Thr  
 85 90 95  
 Asp Pro Lys Asn Gly Ala Phe Ala Glu Tyr Ala Arg Val Tyr Pro Pro  
 100 105 110  
 Leu Phe Tyr Lys Ser Asn Leu Thr His Ser Thr Ala Asp Glu Ile Ser  
 115 120 125  
 Glu Gly Pro Val Lys Asn Phe Glu Ser Ala Ala Ser Leu Pro Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Thr Ala Gly Val Ser Leu Cys His His Leu Gly Ser Lys Met  
 145 150 155 160  
 Glu Trp His Pro Ser Thr Pro Gln His Thr His Pro Leu Leu Ile Trp  
 165 170 175  
 Gly Gly Ala Thr Ala Val Gly Gln Gln Leu Ile Gln Val Ala Lys His  
 180 185 190  
 Ile Asn Ala Tyr Thr Lys Ile Val Thr Val Ala Ser Lys Lys His Glu  
 195 200 205  
 Lys Leu Leu Lys Ser Tyr Gly Ala Asp Asp Val Phe Asp Tyr His Asp  
 210 215 220  
 Ala Gly Val Ile Glu Gln Ile Lys Ser Lys Tyr Pro Asn Leu Gln His  
 225 230 235 240  
 Val Ile Asp Ala Val Gly Ser Glu Asp Ser Ile Pro Glu Ala Tyr Lys

245	250	255	
Val Thr Ala Asp Ser Leu Pro Ala Thr Leu Leu Glu Val Val Pro Met			
260	265	270	
Thr Ile Glu Ser Ile Pro Glu Glu Ile Arg Lys Asp Asn Val Lys Ile			
275	280	285	
Asp Ile Thr Leu Leu Tyr Arg Ala Ser Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly			
290	295	300	
Ala Thr Arg Phe Pro Ala Ser Pro Glu Tyr His Glu Ala Thr Val Lys			
305	310	315	320
Phe Val Lys Phe Ile Asn Pro His Leu Asn Asn Gly Asp Ile His His			
325	330	335	
Met Asn Ile Lys Val Phe Ser Asn Gly Leu Asp Asp Val Pro Ala Leu			
340	345	350	
Thr Glu Gly Ile Lys Glu Gly Lys Asn Lys Asn Val Lys Tyr Val Ala			
355	360	365	
Arg Leu			
370			

<210> 3  
 <211> 1145  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (6)..(1136)

&lt;400&gt; 3

caaac atg tct gcc tcg att cca gaa acc atg aaa gcc gtt gtc att gaa 50

Met Ser Ala Ser Ile Pro Glu Thr Met Lys Ala Val Val Ile Glu

1

5

10

15

aat ggc aag gct gta gtc aaa cag gac att cca att cct gaa tta gaa 98

Asn Gly Lys Ala Val Val Lys Gln Asp Ile Pro Ile Pro Glu Leu Glu

20

25

30

gaa gga ttt gtt cta att aag act gtc gcc gtt gcc ggt aac cct acc 146

Glu Gly Phe Val Leu Ile Lys Thr Val Ala Val Ala Gly Asn Pro Thr

35

40

45

gat tgg aaa cat att gat ttc aag att ggt cct caa ggt gcc ctc tta 194

Asp Trp Lys His Ile Asp Phe Lys Ile Gly Pro Gln Gly Ala Leu Leu

50

55

60

ggc tgt gat gca gcc ggc caa atc gta aag ttg ggc cca aat gtt gat 242

Gly Cys Asp Ala Ala Gly Gln Ile Val Lys Leu Gly Pro Asn Val Asp

65

70

75

gct gca cgc ttt gcc att ggt gat tac att tat ggg gtt att cac ggt 290

Ala Ala Arg Phe Ala Ile Gly Asp Tyr Ile Tyr Gly Val Ile His Gly

80

85

90

95

gct tca gtg agg ttc ccc tca aac ggt gcc ttt gct gag tac tct gcc 338

Ala Ser Val Arg Phe Pro Ser Asn Gly Ala Phe Ala Glu Tyr Ser Ala

100

105

110

att tca tcc gag act gct tat aaa cca gcc aga gag ttt aga ttg tgc 386  
 Ile Ser Ser Glu Thr Ala Tyr Lys Pro Ala Arg Glu Phe Arg Leu Cys  
 115 120 125  
  
 ggt aaa gac aag cta cca gaa ggc ccc gta aaa tct tta gaa ggg gca 434  
 Gly Lys Asp Lys Leu Pro Glu Gly Pro Val Lys Ser Leu Glu Gly Ala  
 130 135 140  
  
 gta tcc ctc cca gtc tca ttg acc acg gct ggt atg atc ctt aca cat 482  
 Val Ser Leu Pro Val Ser Leu Thr Thr Ala Gly Met Ile Leu Thr His  
 145 150 155  
  
 agt ttt ggc ttg gac atg aca tgg aag ccc tcc aaa gcg caa aga gat 530  
 Ser Phe Gly Leu Asp Met Thr Trp Lys Pro Ser Lys Ala Gln Arg Asp  
 160 165 170 175  
  
 caa ccc atc tta ttg tgg ggt ggt gcc act gct gtt ggc cag atg ctt 578  
 Gln Pro Ile Leu Phe Trp Gly Gly Ala Thr Ala Val Gly Gln Met Leu  
 180 185 190  
  
 att caa ttg gca aaa aaa cta aac ggt ttc agc aag atc atc gtc gtt 626  
 Ile Gln Leu Ala Lys Lys Leu Asn Gly Phe Ser Lys Ile Ile Val Val  
 195 200 205  
  
 gct tct cgt aaa cat gaa aaa ttg ttg aaa gag tac ggt gca gat gaa 674  
 Ala Ser Arg Lys His Glu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Ala Asp Glu  
 210 215 220  
  
 ctt ttt gac tac cac gat gct gac gtt atc gaa cag ata aaa aag aag 722

Leu Phe Asp Tyr His Asp Ala Asp Val Ile Glu Gln Ile Lys Lys Lys

225

230

235

tac aac aac att cct tac ttg gtg gac tgt gtc tcc aac aca gaa act 770

Tyr Asn Asn Ile Pro Tyr Leu Val Asp Cys Val Ser Asn Thr Glu Thr

240 245 250 255

att caa cag gtg tac aaa tgt gcc gct gat gac tta gac gct acg gtc 818

Ile Gln Gln Val Tyr Lys Cys Ala Ala Asp Asp Leu Asp Ala Thr Val

260

265

270

gtt caa ttg acc gtt tta acc gaa aaa gat atc aag gag gaa gac agg 866

Val Gln Leu Thr Val Leu Thr Glu Lys Asp Ile Lys Glu Glu Asp Arg

275

280

285

agg caa aac gtc agt att gaa gga acc ctt cta tat ttg ata gga ggt 914

Arg Gln Asn Val Ser Ile Glu Gly Thr Leu Leu Tyr Leu Ile Gly Gly

290

295

300

aac gac gtc cca ttt ggc acg ttt act ttg cca gca gac cct gaa tac 962

Asn Asp Val Pro Phe Gly Thr Phe Thr Leu Pro Ala Asp Pro Glu Tyr

305

310

315

aag gaa gcc gcc ata aaa ttt att aag ttc atc aat cca aaa atc aat 1010

Lys Glu Ala Ala Ile Lys Phe Ile Lys Phe Ile Asn Pro Lys Ile Asn

320 325 330 335

gat ggt gaa atc cac cac atc cca gtg aaa gtt tac aag aac ggg tta 1058

Asp Gly Glu Ile His His Ile Pro Val Lys Val Tyr Lys Asn Gly Leu

340

345

350

gat gat atc cca cag tta ctt gat gat att aag cac ggg agg aat tct 1106  
 Asp Asp Ile Pro Gln Leu Leu Asp Asp Ile Lys His Gly Arg Asn Ser

355

360

365

ggc gaa aag ttg gtt gcc gtc ttg aaa taa tctagactg 1145  
 Gly Glu Lys Leu Val Ala Val Leu Lys

370

375

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 376

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 4

Met Ser Ala Ser Ile Pro Glu Thr Met Lys Ala Val Val Ile Glu Asn  
 1 5 10 15

Gly Lys Ala Val Val Lys Gln Asp Ile Pro Ile Pro Glu Leu Glu Glu  
 20 25 30

Gly Phe Val Leu Ile Lys Thr Val Ala Val Ala Gly Asn Pro Thr Asp  
 35 40 45

Trp Lys His Ile Asp Phe Lys Ile Gly Pro Gln Gly Ala Leu Leu Gly  
 50 55 60

Cys Asp Ala Ala Gly Gln Ile Val Lys Leu Gly Pro Asn Val Asp Ala  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ala Ile Gly Asp Tyr Ile Tyr Gly Val Ile His Gly Ala  
 85 90 95

Ser Val Arg Phe Pro Ser Asn Gly Ala Phe Ala Glu Tyr Ser Ala Ile  
 100 105 110  
 Ser Ser Glu Thr Ala Tyr Lys Pro Ala Arg Glu Phe Arg Leu Cys Gly  
 115 120 125  
 Lys Asp Lys Leu Pro Glu Gly Pro Val Lys Ser Leu Glu Gly Ala Val  
 130 135 140  
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Thr Thr Ala Gly Met Ile Leu Thr His Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Gly Leu Asp Met Thr Trp Lys Pro Ser Lys Ala Gln Arg Asp Gln  
 165 170 175  
 Pro Ile Leu Phe Trp Gly Ala Thr Ala Val Gly Gln Met Leu Ile  
 180 185 190  
 Gln Leu Ala Lys Lys Leu Asn Gly Phe Ser Lys Ile Ile Val Val Ala  
 195 200 205  
 Ser Arg Lys His Glu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Ala Asp Glu Leu  
 210 215 220  
 Phe Asp Tyr His Asp Ala Asp Val Ile Glu Gln Ile Lys Lys Tyr  
 225 230 235 240  
 Asn Asn Ile Pro Tyr Leu Val Asp Cys Val Ser Asn Thr Glu Thr Ile  
 245 250 255  
 Gln Gln Val Tyr Lys Cys Ala Ala Asp Asp Leu Asp Ala Thr Val Val  
 260 265 270  
 Gln Leu Thr Val Leu Thr Glu Lys Asp Ile Lys Glu Glu Asp Arg Arg  
 275 280 285  
 Gln Asn Val Ser Ile Glu Gly Thr Leu Leu Tyr Leu Ile Gly Gly Asn  
 290 295 300  
 Asp Val Pro Phe Gly Thr Phe Thr Leu Pro Ala Asp Pro Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Ala Ile Lys Phe Ile Lys Phe Ile Asn Pro Lys Ile Asn Asp

325	330	335
Gly Glu Ile His His Ile Pro Val Lys Val Tyr Lys Asn Gly Leu Asp		
340	345	350
Asp Ile Pro Gln Leu Leu Asp Asp Ile Lys His Gly Arg Asn Ser Gly		
355	360	365
Glu Lys Leu Val Ala Val Leu Lys		
370	375	

<210> 5

<211> 1134

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1134)

<400> 5

atg gct caa gtt gca att cca gaa acc atg aag gct gtc gtc att gaa 48

Met Ala Gln Val Ala Ile Pro Glu Thr Met Lys Ala Val Val Ile Glu

1

5

10

15

gac ggt aaa gcg gtt gtt aaa gag ggc att ccc att cct gaa ttg gaa 96

Asp Gly Lys Ala Val Val Lys Glu Gly Ile Pro Ile Pro Glu Leu Glu

20

25

30

gaa gga ttc gta ttg att aag aca ctc gct gtt gct ggt aac ccc act 144

Glu Gly Phe Val Leu Ile Lys Thr Leu Ala Val Ala Gly Asn Pro Thr

35

40

45

gat tgg gca cac att gac tac aag atc ggg cct caa gga tct att ctg 192

Asp Trp Ala His Ile Asp Tyr Lys Ile Gly Pro Gln Gly Ser Ile Leu

50

55

60

gga tgt gat gct ggc caa att gtc aaa ttg ggc cca gct gtc aat 240

Gly Cys Asp Ala Ala Gly Gln Ile Val Lys Leu Gly Pro Ala Val Asn

65

70

75

80

cct aaa gac ttt tct atc ggt gat tat att tat ggg ttc att cac gga 288

Pro Lys Asp Phe Ser Ile Gly Asp Tyr Ile Tyr Gly Phe Ile His Gly

85

90

95

tct tcc gta agg ttt cct tcc aat ggt gct ttt gct gaa tat tct gct 336

Ser Ser Val Arg Phe Pro Ser Asn Gly Ala Phe Ala Glu Tyr Ser Ala

100

105

110

att tca act gtg gtt gcc tac aaa tca ccc aat gaa ctc aaa ttt ttg 384

Ile Ser Thr Val Val Ala Tyr Lys Ser Pro Asn Glu Leu Lys Phe Leu

115

120

125

ggg gag gat gtt cta cct gcc ggc cct gtc agg tct ttg gaa ggt gta 432

Gly Glu Asp Val Leu Pro Ala Gly Pro Val Arg Ser Leu Glu Gly Val

130

135

140

gcc act atc cca gtg tca ctg acc aca gcc ggc ttg gtg ttg acc tat 480

Ala Thr Ile Pro Val Ser Leu Thr Thr Ala Gly Leu Val Leu Thr Tyr

145

150

155

160

aac ttg ggc ttg gac ctg aag tgg gag cca tca acc cca caa aga aaa 528

Asn Leu Gly Leu Asp Leu Lys Trp Glu Pro Ser Thr Pro Gln Arg Lys

165

170

175

ggc ccc atc tta tta tgg ggc ggt gca act gca gta ggt cag tcg ctc 576

Gly Pro Ile Leu Leu Trp Gly Gly Ala Thr Ala Val Gly Gln Ser Leu

180

185

190

atc caa tta gcc aat aaa ttg aat ggc ttc acc aag atc att gtt gtg 624

Ile Gln Leu Ala Asn Lys Leu Asn Gly Phe Thr Lys Ile Ile Val Val

195

200

205

gct tct cgg aag cac gaa aaa ctt ttg aaa gaa tat ggt gct gat gaa 672

Ala Ser Arg Lys His Glu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Ala Asp Glu

210

215

220

tta ttt gat tat cat gat att gac gtg gta gaa caa att aaa cac aag 720

Leu Phe Asp Tyr His Asp Ile Asp Val Val Glu Gln Ile Lys His Lys

225

230

235

240

tac aac aat atc tcg tat tta gtc gac tgt gtc gcg aat caa gat acg 768

Tyr Asn Asn Ile Ser Tyr Leu Val Asp Cys Val Ala Asn Gln Asp Thr

245

250

255

ctt caa caa gtg tac aaa tgt gcg gcc gat aaa cag gat gct aca att 816

Leu Gln Gln Val Tyr Lys Cys Ala Ala Asp Lys Gln Asp Ala Thr Ile

260

265

270

gtt gaa tta aaa aat ttg aca gaa gaa aac gtc aaa aaa gag aac agg 864  
 Val Glu Leu Lys Asn Leu Thr Glu Glu Asn Val Lys Lys Glu Asn Arg  
 275 280 285

aga caa aac gtt act att gac ata ata agg cta tat tca ata ggt ggc 912  
 Arg Gln Asn Val Thr Ile Asp Ile Ile Arg Leu Tyr Ser Ile Gly Gly  
 290 295 300

cat gaa gta cca ttt gga aac att act tta cca gcc gac tca gaa gct 960  
 His Glu Val Pro Phe Gly Asn Ile Thr Leu Pro Ala Asp Ser Glu Ala  
 305 310 315 320

agg aaa gct gca ata aaa ttt atc aaa ttc atc aat cca aag att aat 1008  
 Arg Lys Ala Ala Ile Lys Phe Ile Lys Phe Ile Asn Pro Lys Ile Asn  
 325 330 335

gat gga caa att cgc cat att cca gta agg gtc tat aag aac ggg ctt 1056  
 Asp Gly Gln Ile Arg His Ile Pro Val Arg Val Tyr Lys Asn Gly Leu  
 340 345 350

tgt gat gtt cct cat atc cta aaa gac atc aaa tat ggt aag aac tct 1104  
 Cys Asp Val Pro His Ile Leu Lys Asp Ile Lys Tyr Gly Lys Asn Ser  
 355 360 365

ggt gaa aaa ctc gtt gcc gta tta aac taa 1134  
 Gly Glu Lys Leu Val Ala Val Leu Asn  
 370 375

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 377

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 6

Met	Ala	Gln	Val	Ala	Ile	Pro	Glu	Thr	Met	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Glu
1					5				10					15	
Asp	Gly	Lys	Ala	Val	Val	Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Ile	Pro	Glu	Leu	Glu
					20				25				30		
Glu	Gly	Phe	Val	Leu	Ile	Lys	Thr	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr
					35				40			45			
Asp	Trp	Ala	His	Ile	Asp	Tyr	Lys	Ile	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Ile	Leu
					50				55			60			
Gly	Cys	Asp	Ala	Ala	Gly	Gln	Ile	Val	Lys	Leu	Gly	Pro	Ala	Val	Asn
					65				70			75		80	
Pro	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile	Gly	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ile	His	Gly
					85				90			95			
Ser	Ser	Val	Arg	Phe	Pro	Ser	Asn	Gly	Ala	Phe	Ala	Glu	Tyr	Ser	Ala
					100				105			110			
Ile	Ser	Thr	Val	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Pro	Asn	Glu	Leu	Lys	Phe	Leu
					115				120			125			
Gly	Glu	Asp	Val	Leu	Pro	Ala	Gly	Pro	Val	Arg	Ser	Leu	Glu	Gly	Val
					130				135			140			
Ala	Thr	Ile	Pro	Val	Ser	Leu	Thr	Thr	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Thr	Tyr
					145				150			155		160	
Asn	Leu	Gly	Leu	Asp	Leu	Lys	Trp	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	Gln	Arg	Lys
					165				170			175			

Gly Pro Ile Leu Leu Trp Gly Gly Ala Thr Ala Val Gly Gln Ser Leu  
 180 185 190  
 Ile Gln Leu Ala Asn Lys Leu Asn Gly Phe Thr Lys Ile Ile Val Val  
 195 200 205  
 Ala Ser Arg Lys His Glu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Ala Asp Glu  
 210 215 220  
 Leu Phe Asp Tyr His Asp Ile Asp Val Val Glu Gln Ile Lys His Lys  
 225 230 235 240  
 Tyr Asn Asn Ile Ser Tyr Leu Val Asp Cys Val Ala Asn Gln Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Gln Gln Val Tyr Lys Cys Ala Ala Asp Lys Gln Asp Ala Thr Ile  
 260 265 270  
 Val Glu Leu Lys Asn Leu Thr Glu Glu Asn Val Lys Lys Glu Asn Arg  
 275 280 285  
 Arg Gln Asn Val Thr Ile Asp Ile Ile Arg Leu Tyr Ser Ile Gly Gly  
 290 295 300  
 His Glu Val Pro Phe Gly Asn Ile Thr Leu Pro Ala Asp Ser Glu Ala  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Ala Ala Ile Lys Phe Ile Lys Phe Ile Asn Pro Lys Ile Asn  
 325 330 335  
 Asp Gly Gln Ile Arg His Ile Pro Val Arg Val Tyr Lys Asn Gly Leu  
 340 345 350  
 Cys Asp Val Pro His Ile Leu Lys Asp Ile Lys Tyr Gly Lys Asn Ser  
 355 360 365  
 Gly Glu Lys Leu Val Ala Val Leu Asn  
 370 375

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1122

&lt;212&gt; DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (7)..(1113)

&lt;400&gt; 7

gaaatc atg aaa gct gtc gtc att gaa gac ggt aaa gcg gtt gtc aaa 48  
 Met Lys Ala Val Val Ile Glu Asp Gly Lys Ala Val Val Lys  
 1 5 10

gag ggc gtt ccc att cct gaa ttg gaa gaa gga ttc gta ttg att aag 96  
 Glu Gly Val Pro Ile Pro Glu Leu Glu Gly Phe Val Leu Ile Lys  
 15 20 25 30

aca ctc gct gct ggt aac ccg act gat tgg gca cac att gac tac 144  
 Thr Leu Ala Val Ala Gly Asn Pro Thr Asp Trp Ala His Ile Asp Tyr  
 35 40 45

aag gtc ggg cct caa gga tct att ctg gga tgt gac gct gcc ggc caa 192  
 Lys Val Gly Pro Gln Gly Ser Ile Leu Gly Cys Asp Ala Ala Gly Gln  
 50 55 60

att gtc aaa ttg ggc cca gcc gtc gat cct aaa gac ttt tct att ggt 240  
 Ile Val Lys Leu Gly Pro Ala Val Asp Pro Lys Asp Phe Ser Ile Gly  
 65 70 75

gat tat att tat ggg ttc att cac gga tct tcc gta agg ttt cct tcc 288  
 Asp Tyr Ile Tyr Gly Phe Ile His Gly Ser Ser Val Arg Phe Pro Ser  
 80 85 90

aat ggt gct ttt gct gaa tat tct gct att tca act gtg gtt gcc tac 336  
 Asn Gly Ala Phe Ala Glu Tyr Ser Ala Ile Ser Thr Val Val Ala Tyr  
 95 100 105 110

aaa tca ccc aat gaa ctc aaa ttt ttg ggt gaa gat gtt cta cct gcc 384  
 Lys Ser Pro Asn Glu Leu Lys Phe Leu Gly Glu Asp Val Leu Pro Ala  
 115 120 125

ggc cct gtc agg tct ttg gaa ggg gca gcc act atc cca gtg tca ctg 432  
 Gly Pro Val Arg Ser Leu Glu Gly Ala Ala Thr Ile Pro Val Ser Leu  
 130 135 140

acc aca gct ggc ttg gtg ttg acc tat aac ttg ggc ttg aac ctg aag 480  
 Thr Thr Ala Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asn Leu Gly Leu Asn Leu Lys  
 145 150 155

tgg gag cca tca acc ccā caa aga aac ggc ccc atc tta tta tgg ggc 528  
 Trp Glu Pro Ser Thr Pro Gln Arg Asn Gly Pro Ile Leu Leu Trp Gly  
 160 165 170

ggt gca act gca gta ggt cag tcg ctc atc caa tta gcc aat aaa ttg 576  
 Gly Ala Thr Ala Val Gly Gln Ser Leu Ile Gln Leu Ala Asn Lys Leu  
 175 180 185 190

aat ggc ttc acc aag atc att gtt gtg gct tct cgg aaa cac gaa aaa 624  
 Asn Gly Phe Thr Lys Ile Ile Val Val Ala Ser Arg Lys His Glu Lys  
 195 200 205

ctg ttg aaa gaa tat ggt gct gat caa cta ttt gat tac cat gat att 672  
 Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Ala Asp Gln Leu Phe Asp Tyr His Asp Ile  
 210 215 220

gac gtg gta gaa caa att aaa cac aag tac aac aat atc tcg tat tta 720  
 Asp Val Val Glu Gln Ile Lys His Lys Tyr Asn Asn Ile Ser Tyr Leu  
 225 230 235

gtc gac tgt gtc gcg aat caa aat acg ctt caa caa gtg tac aaa tgt 768  
 Val Asp Cys Val Ala Asn Gln Asn Thr Leu Gln Gln Val Tyr Lys Cys  
 240 245 250

gcg gcc gat aaa cag gat gct acc gtt gtc gaa tta act aat ttg aca 816  
 Ala Ala Asp Lys Gln Asp Ala Thr Val Val Glu Leu Thr Asn Leu Thr  
 255 260 265 270

gaa gaa aac gtc aaa aag gag aat agg agg caa aat gtc act att gac 864  
 Glu Glu Asn Val Lys Lys Glu Asn Arg Arg Gln Asn Val Thr Ile Asp  
 275 280 285

aga aca aga ctg tat tca ata ggc ggc cat gaa gta cca ttt ggt ggc 912  
 Arg Thr Arg Leu Tyr Ser Ile Gly Gly His Glu Val Pro Phe Gly Gly  
 290 295 300

att act ttc cct gct gac cca gaa gcc agg aga gct gcc acc gaa ttc 960

Ile Thr Phe Pro Ala Asp Pro Glu Ala Arg Arg Ala Ala Thr Glu Phe

305

310

315

gtc aag ttc atc aat cca aag att agt gat ggg caa att cac cat att 1008

Val Lys Phe Ile Asn Pro Lys Ile Ser Asp Gly Gln Ile His His Ile

320

325

330

cca gca agg gtc tat aag aac ggg ctt tac gat gtt cct cgt atc ctg 1056

Pro Ala Arg Val Tyr Lys Asn Gly Leu Tyr Asp Val Pro Arg Ile Leu

335

340

345

350

gaa gac att aaa atc ggt aag aac tct ggt gaa aaa ctc gtt gcc gta 1104

Glu Asp Ile Lys Ile Gly Lys Asn Ser Gly Glu Lys Leu Val Ala Val

355

360

365

tta aac taa tctagaaac 1122

Leu Asn

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 368

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 8

Met Lys Ala Val Val Ile Glu Asp Gly Lys Ala Val Val Lys Glu Gly

1

5

10

15

Val Pro Ile Pro Glu Leu Glu Gly Phe Val Leu Ile Lys Thr Leu

20

25

30

Ala Val Ala Gly Asn Pro Thr Asp Trp Ala His Ile Asp Tyr Lys Val  
 35 40 45  
 Gly Pro Gln Gly Ser Ile Leu Gly Cys Asp Ala Ala Gly Gln Ile Val  
 50 55 60  
 Lys Leu Gly Pro Ala Val Asp Pro Lys Asp Phe Ser Ile Gly Asp Tyr  
 65 70 75 80  
 Ile Tyr Gly Phe Ile His Gly Ser Ser Val Arg Phe Pro Ser Asn Gly  
 85 90 95  
 Ala Phe Ala Glu Tyr Ser Ala Ile Ser Thr Val Val Ala Tyr Lys Ser  
 100 105 110  
 Pro Asn Glu Leu Lys Phe Leu Gly Glu Asp Val Leu Pro Ala Gly Pro  
 115 120 125  
 Val Arg Ser Leu Glu Gly Ala Ala Thr Ile Pro Val Ser Leu Thr Thr  
 130 135 140  
 Ala Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asn Leu Gly Leu Asn Leu Lys Trp Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Ser Thr Pro Gln Arg Asn Gly Pro Ile Leu Leu Trp Gly Gly Ala  
 165 170 175  
 Thr Ala Val Gly Gln Ser Leu Ile Gln Leu Ala Asn Lys Leu Asn Gly  
 180 185 190  
 Phe Thr Lys Ile Ile Val Val Ala Ser Arg Lys His Glu Lys Leu Leu  
 195 200 205  
 Lys Glu Tyr Gly Ala Asp Gln Leu Phe Asp Tyr His Asp Ile Asp Val  
 210 215 220  
 Val Glu Gln Ile Lys His Lys Tyr Asn Asn Ile Ser Tyr Leu Val Asp  
 225 230 235 240  
 Cys Val Ala Asn Gln Asn Thr Leu Gln Gln Val Tyr Lys Cys Ala Ala  
 245 250 255  
 Asp Lys Gln Asp Ala Thr Val Val Glu Leu Thr Asn Leu Thr Glu Glu

260

265

270

Asn Val Lys Lys Glu Asn Arg Arg Gln Asn Val Thr Ile Asp Arg Thr

275

280

285

Arg Leu Tyr Ser Ile Gly Gly His Glu Val Pro Phe Gly Gly Ile Thr

290

295

300

Phe Pro Ala Asp Pro Glu Ala Arg Arg Ala Ala Thr Glu Phe Val Lys

305 310 315 320

Phe Ile Asn Pro Lys Ile Ser Asp Gly Gln Ile His His Ile Pro Ala

325

330

335

Arg Val Tyr Lys Asn Gly Leu Tyr Asp Val Pro Arg Ile Leu Glu Asp

340

345

350

Ile Lys Ile Gly Lys Asn Ser Gly Glu Lys Leu Val Ala Val Leu Asn

355

360

365

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kluyveromyces lactis

&lt;400&gt; 9

Ser Tyr Gly Ala Asp Asp Val Phe Asp Tyr His Asp

1

5

10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kluyveromyces lactis

&lt;400&gt; 10

Ile Gly Pro Glu Gly Ser Ile Leu Gly Cys Asp Ile

1

5

10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (12)

&lt;223&gt; n indicates g, a, c or t.

&lt;400&gt; 11

tgrtartcra anacrtcrtc

20

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)

<223> n indicates g, a, c or t.

<400> 12

atwgghccwg argghtcnat

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)

<223> n indicates g, a, c or t.

<400> 13

atwgghccng argghagyat

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 509

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kluyveromyces lactis

&lt;400&gt; 14

attggtccwg arggytcwat tctaggatgt gacattgctg gtacagttgt caaacttgga 60  
 ccaaatgcta gtactgactt gaaggttgga gataccggtt tcggtttgt tcacggtgct 120  
 tcccaaacag atcctaaaaa tggtgcattt gctgaatatg ccagggttt a tccacccttt 180  
 ttttacaaga gtaacttaac tcactcaact gctgatgaaa tttctgaagg cccctgtgaag 240  
 aacttcgaat ctgctgcattt attgccagtt tcgttgacaa ctgctggtgt tagtttgtt 300  
 catcacttgg gctcaaaaat ggaatggcac ccatctaccc cgcaacatac tcatccatta 360  
 ttgatttggg gtggtgctac agcagtgggt caacaactaa tccaaaggc caaacatatac 420  
 aatgcttata ctaagattgt aactgttgct tctaaaaagc atgaaaagct tttaaagtct 480  
 tatggtgctg atgacgtmtt cgactacca

509

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially  
 synthesized primer sequence

<400> 15

tccggtaaccg acaactgtac cagcaatgtc

30

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

atcggtacct atactaagat tgtaactgtt gc

32

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

ccgggtaccc ttttagggtg a

21

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

tcatgaagcc acagttaaat tcg

23

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

atattcatat gatggatatac accg

24

<210> 20

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

ctggaaattct accatggctt cagttccaaac cactcaaaaa g

41

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 21

gacaagcttc tagattataa cctggcaaca tacttaaca

39

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence.

&lt;400&gt; 22

caaacatgtc tgcctcgatt ccaga

25

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 23

cagtc tagat tatttcaaga cggcaaccaa c

31

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 24

caaccatggc tcaagttgca attccagaaa cc

32

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 25

gactcttagat tagtttaata cggcaacgag ttttcac

38

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 26

gaaatcatga aagctgtcgt cattgaa

27

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 27

gtttctagat tagtttaata cggcaackag tttttca

37

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 28

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 29

caggaaacag ctatgacc

18

【図面の簡単な説明】

【図1】 SDS-PAGEにおけるパターンを示す写真である。レーン1は分子量マーカー、レーン2は実施例1で得られた酵素を示す。

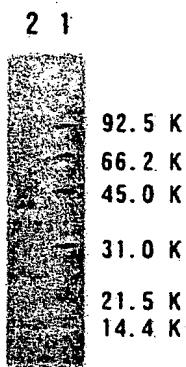
【図2】 実施例1で得られた酵素のメチルビニルケトン還元活性のpH依存性を示す図である。

【図3】 実施例1で得られた酵素のメチルビニルケトン還元活性の温度依存性を示す図である。

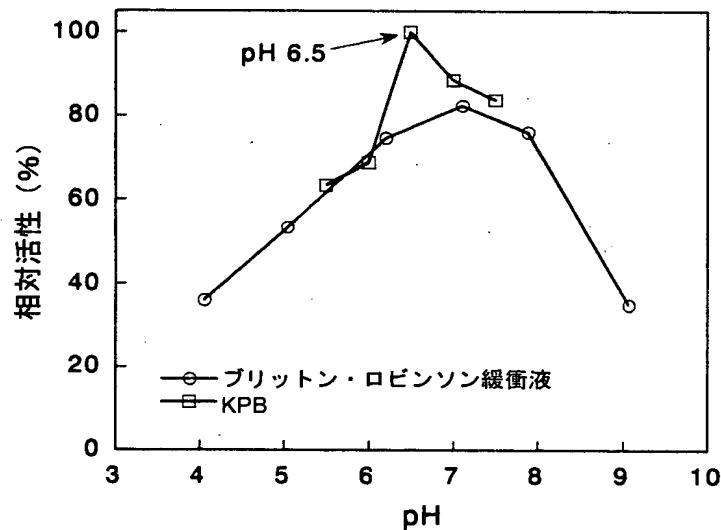
【図4】 エノン還元酵素遺伝子を持つプラスミドpSE-KLR1を模式的に示した図である。

【書類名】 図面

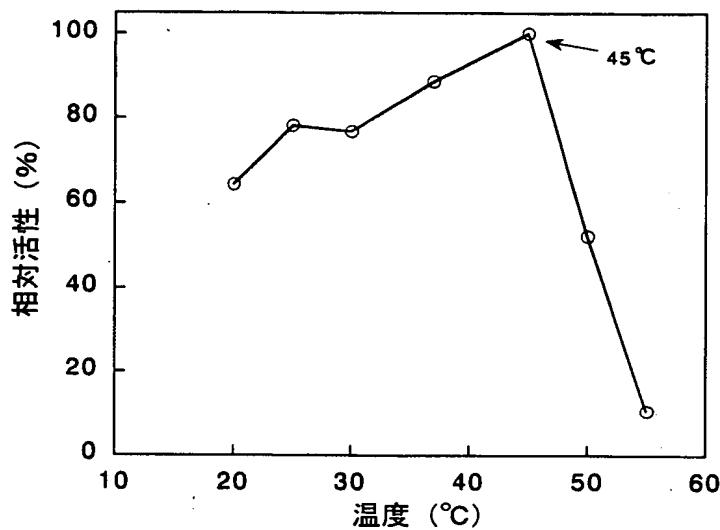
【図1】



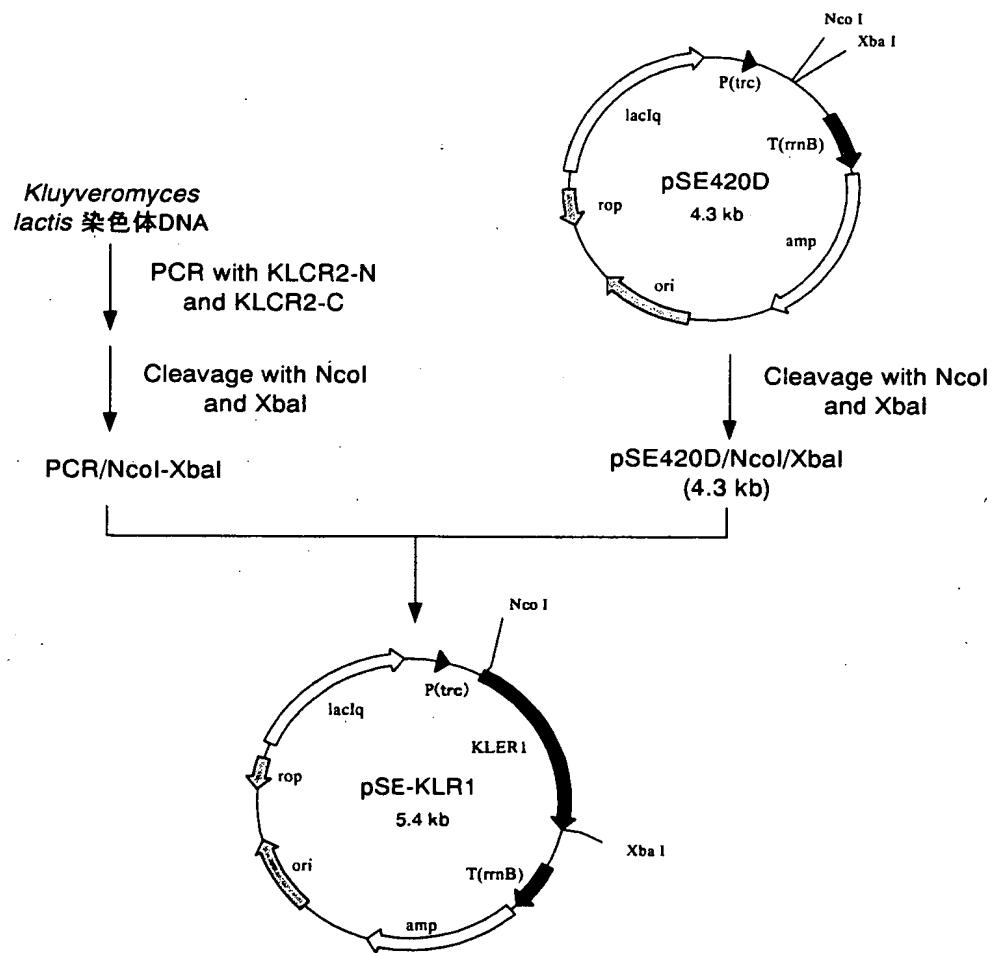
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ケトンの製造に有用な新規エノン還元酵素の提供。

【解決手段】 *Kluyveromyces*属に由来する新規エノン還元酵素が提供された。

また本発明は、該酵素をコードする遺伝子、該酵素を含むベクター、形質転換体をも提供する。更に本発明は、酵母に由来するエノン還元酵素を提供する。これらのエノン還元酵素により、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンの炭素-炭素2重結合を選択的に還元する方法が提供される。

【効果】

医薬品原料などとして有用なケトンを、酵素的な反応によって製造することができる。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000002901]

1. 変更年月日 1990年 8月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府堺市鉄砲町1番地  
氏 名 ダイセル化学工業株式会社